

# **Charakterisierung der Platinsensitivität von cisplatinsensitiven und -resistenten Tumorzellen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

JOCHEN ZISOWSKY

aus Simmerath

Bonn 2004

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

im Rahmen des Graduiertenkollegs 677/1

„STRUKTUR UND MOLEKULARE INTERAKTION ALS BASIS DER ARZNEIMITTELWIRKUNG“

mit freundlicher Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft

1. Referent: Prof. Dr. U. Jaehde

2. Referent: PD Dr. M.U. Kassack

Tag der Promotion: 22.12.2004

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn

[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Die vorliegende Arbeit wurde am Pharmazeutischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität unter Leitung von Herrn Prof. Dr. U. Jaehde angefertigt.

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Jaehde für die Überlassung des sehr interessanten Themas und die volle und fördernde Unterstützung und Diskussionsbereitschaft beim Erstellen dieser Arbeit. Die mir gewährten Freiräume und das entgegengebrachte Vertrauen habe ich sehr zu schätzen gewusst.

Herrn PD Dr. M.U. Kassack danke ich für die Übernahme des Koreferates und für den guten und konstruktiven Gedankenaustausch während meiner Promotionszeit.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. K. Mohr und dem gesamten Graduiertenkolleg für die sehr interessante und lehrreiche Zeit und für die Möglichkeit, über das eigene Arbeitsgebiet hinaus Wissen und Erfahrungen zu sammeln.

Herrn Stefan Leyers und Frau Silke Weykam danke ich für die tatkräftige Unterstützung und die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt Frau Dr. Anne Pieck für ihre stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung und die sehr guten Diskussionen während meiner ganzen Promotionszeit. Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. Achim Becker für die tatkräftige Unterstützung und Hilfsbereitschaft in analytischen Fragestellungen.

Den Kooperationspartnern Prof. Dr. B. Kaina und R. Tsaryk aus Mainz, Prof. M. Osmak und Dr. A. Brozovic aus Zagreb und PD Dr. D. Strumberg und Dr. M. Heim aus Essen danke ich für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit, den fruchtbaren Gedankenaustausch und die Hilfestellungen bei den gemeinsamen Projekten.

Anne Pieck, Meike Eckhardt und Sven Simons danke ich für das gewissenhafte Korrekturlesen meiner Arbeit.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern des Zelllabors für die gute Zusammenarbeit und die freundschaftliche Atmosphäre.

Mein besonderer Dank gilt allen Mitgliedern des Arbeitskreises Klinische Pharmazie. Die überaus hilfsbereite und freundschaftliche Atmosphäre auch über die Arbeit hinaus hat immer neue Motivation gegeben und wird mir in bester Erinnerung bleiben.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, die mir meinen Werdegang ermöglicht und mich in allen Phasen meiner Ausbildung vollstens unterstützt haben.

Für meine Eltern

„In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern, die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben, während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.“

Sir Isaak Newton

---

<b>ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>V</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 Platinkomplexe in der Therapie maligner Erkrankungen .....	1
1.2 Cisplatin .....	3
1.2.1 Wirkungsmechanismus von Cisplatin .....	3
1.2.2 Wirksamkeit und klinische Bedeutung .....	6
1.3 Platinsensitivität und -resistenz .....	10
1.3.1 Zelluläre Prozesse nach Bildung von Platin-DNA-Addukten .....	10
1.3.2 Resistenzmechanismen .....	14
1.3.3 Klinische Bedeutung .....	21
1.4 Tumorzelllinien zur Untersuchung von Resistenzmechanismen .....	22
1.5 Zielsetzung .....	23
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>24</b>
2.1 Material .....	24
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien .....	24
2.1.2 Hergestellte Puffer und Lösungen .....	25
2.1.3 Verbrauchsmaterialien .....	28
2.1.4 Geräte .....	28
2.1.5 Zelllinien .....	29
2.2 Zellkultur .....	30
2.2.1 Auftauen der Zellen .....	30
2.2.2 Zellvermehrung .....	31
2.2.3 <i>Splitten</i> der Zellen .....	31

---

2.2.4	Bestimmung der Zellzahl .....	32
2.2.5	Lagerung der Zellen.....	32
<b>2.3</b>	<b>Zytotoxizitätstest.....</b>	<b>32</b>
2.3.1	MTT-Assay .....	32
2.3.2	Bestimmung des Resistenzgrades .....	34
<b>2.4</b>	<b>Inkubationsversuche mit Cisplatin .....</b>	<b>35</b>
2.4.1	DNA-Platinierung .....	35
2.4.2	DNA-Reparatur .....	36
2.4.3	Intrazelluläre Platinkonzentrationen.....	36
<b>2.5</b>	<b>Analytik von Platin mittels Atomabsorptionsspektrometrie.....</b>	<b>39</b>
2.5.1	Messbedingungen .....	41
2.5.2	Quantifizierung der intrazellulären Platinkonzentration.....	45
2.5.3	Quantifizierung der DNA-Platinierung .....	46
2.5.4	Quantifizierung der DNA-Reparaturgeschwindigkeit.....	49
<b>2.6</b>	<b>Quantifizierung der intrazellulären Glutathionkonzentrationen.....</b>	<b>50</b>
2.6.1	Trennsystem und Detektion .....	50
2.6.2	Probenvorbereitung und Derivatisierung .....	50
2.6.3	Validierung.....	51
<b>2.7</b>	<b>Statistik .....</b>	<b>55</b>
2.7.1	Deskriptive Statistik .....	55
2.7.2	Beurteilende Statistik .....	55
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>58</b>
<b>3.1</b>	<b>Charakterisierung der Zelllinien.....</b>	<b>58</b>
3.1.1	Bestimmung der Zellzahl und des Zellvolumens.....	58
3.1.2	Bestimmung der EC <sub>50</sub> und des Resistenzgrades.....	59

---

<b>3.2</b>	<b>Quantifizierung der DNA-Platinierung</b> .....	<b>64</b>
3.2.1	Einfluss von Ribonuclease auf die DNA-Platinierung .....	65
3.2.2	Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit .....	66
3.2.3	DNA-Platinierung verschiedener Zelllinien .....	67
3.2.4	DNA-Platinierung und Resistenzgrad .....	72
<b>3.3</b>	<b>Quantifizierung der DNA-Reparaturgeschwindigkeit</b> .....	<b>72</b>
3.3.1	DNA-Reparatur in Ovarialkarzinomzellen A2780 und A2780 cis .....	73
3.3.2	DNA-Reparatur in Zervixkarzinomzellen HeLa und HeLa CK .....	76
<b>3.4</b>	<b>Quantifizierung der intrazellulären Platinkonzentrationen</b> .....	<b>78</b>
3.4.1	Uptake .....	79
3.4.2	Efflux .....	83
<b>3.5</b>	<b>Anwendungen der Quantifizierung von DNA-Platinierung und intrazellulärer Platinkonzentration</b> .....	<b>88</b>
3.5.1	DNA-Platinierung und intrazelluläre Platinkonzentration in Hamster-Fibroblasten.....	88
3.5.2	Einfluss eines Raf-Kinase-Inhibitors auf die DNA-Platinierung und die intrazelluläre Platinkonzentration.....	90
<b>3.6</b>	<b>Quantifizierung der intrazellulären Glutathionkonzentration</b> .....	<b>93</b>
3.6.1	Validierung .....	93
3.6.2	Intrazelluläre Glutathionkonzentrationen in Tumorzellen.....	99
<b>3.7</b>	<b>Vergleich der untersuchten Parameter</b> .....	<b>100</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>101</b>
<b>4.1</b>	<b>Charakterisierung von Tumorzelllinien</b> .....	<b>101</b>
<b>4.2</b>	<b>DNA-Platinierung</b> .....	<b>103</b>
<b>4.3</b>	<b>Geschwindigkeit der DNA-Reparatur</b> .....	<b>106</b>

---

<b>4.4</b>	<b>Uptake und Efflux.....</b>	<b>109</b>
<b>4.5</b>	<b>Anwendungen der Quantifizierung von DNA-Platinierung und intrazellulärer Platinkonzentration .....</b>	<b>114</b>
<b>4.6</b>	<b>Intrazelluläre Glutathionkonzentrationen.....</b>	<b>115</b>
<b>4.7</b>	<b>Bedeutung der verschiedenen Parameter für die quantitative Beurteilung der Platinsensitivität.....</b>	<b>119</b>
<b>4.8</b>	<b>Schlussfolgerung und Ausblick.....</b>	<b>119</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>121</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>122</b>



## Abkürzungen

A	Absorption
A <sub>r</sub>	Relative Atommasse
AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
Abb.	Abbildung
AE	Elutionspuffer
AL	Arbeitslösung
AW	Waschpuffer
AS	Aminosäure
ATP7A	Adenosintriphosphatase Alpha-Polypeptid
ATP7B	Adenosintriphosphatase Beta-Polypeptid
BSO	Buthioninsulfoximin
C	Konzentration
CA	Karzinom
CE	Kapillarelektrophorese
Cis	Cisplatin
cMOAT	Canicular Multispecific Organic Anion Transporter
CTR1	Copper Transporter 1
Cu	Kupfer
CZE	Kapillarzonenelektrophorese
d	Tag
DACH	Diaminocyclohexan
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC <sub>50</sub>	Halbmaximale, effektive Konzentration
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERCC1	Excision Repair Cross Complementing 1
FAAS	Flammenlose Atomabsorptionsspektrometrie
FCM	Flow Cytometry (Durchflusszytometrie)
FKS	Fetales Kälberserum

---

GF-AAS	Graphitrohrfen-Atomabsorptionsspektrometrie
Gl.	Gleichung
GSH	Reduziertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTA	Graphite Tube Atomizer
HMG	High Mobility Group
5-HT <sub>3</sub>	Serotonin
ID	Innendurchmesser
k.A.	Keine Angabe
KPF	Korrigierte Peakfläche
LAF	Laminar-Air-Flow
LIF	Laserinduzierte Fluoreszenz
LC	Flüssigchromatographie
M	Molare Masse
MDR	Multi Drug Resistance
MMR	Mismatch-Reparatur
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MRP2	MDR-assoziiertes Protein
MT	Metallothionein
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
n.b.	Nicht bestimmt
NSCLC	Nicht Kleinzelliges Lungenkarzinom
NDA	Naphthalendialdehyd
NER	Nukleotid-Exzisionsreparatur
OD	Außendurchmesser
Oxa	Oxaliplatin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PP	Polypropylen
PROMT	Precision Optimized Measurement Time
q. s.	Quantum satis = so viel, wie notwendig
PSD	Programmable Sample Dispenser
Pt	Platin
QC	Quality Control

---

r	Korrelationskoeffizient
RAGE	Renaturierende Agarosegelelektrophorese
rDNA	Ribosomale Desoxyribonukleinsäure
RE	Relativer Fehler
RFU	Relative Fluoreszenz-Einheit
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RSD	Relative Standardabweichung
SCLC	Kleinzelliges Lungenkarzinom
SD	Standardabweichung
SL	Stammlösung
SOD	Superoxyd-Dismutase
SRB	Sulforhodamin B
Tab.	Tabelle
TS	Testsubstanz
UBF	Upstream Binding Faktor
UV / VIS	Ultraviolettes / sichtbares Licht
XPA	Xeroderma Pigmentosum Complementation Group A



# 1 Einleitung

## 1.1 Platinkomplexe in der Therapie maligner Erkrankungen

Platinkomplexe sind feste Bestandteile in der modernen antineoplastischen Chemotherapie. Diese gehört neben der Chirurgie und der Strahlentherapie zu den drei Säulen der Therapie maligner Erkrankungen.

Der erste Vertreter der Platinkomplexe ist das Cisplatin [cis-Diammindichloroplatin(II)] (Abb. 1.1), von dessen chemischer Struktur schon 1844 *Peyrone* in *Liebigs Annalen der Chemie* berichtet<sup>1</sup>.

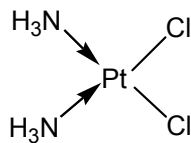


Abb. 1.1 Chemische Struktur von Cisplatin

Seine zytotoxische Wirkung wurde jedoch erst 1965 durch Zufall von *Rosenberg et al.* entdeckt. Bei der Beobachtung des Bakterienwachstums unter dem Einfluss eines elektrischen Felds fiel auf, dass die Zellteilung gehemmt wurde. Ursache für dieses Phänomen war jedoch nicht das elektrische Feld, sondern Platinkomplexe, die sich aus den Platinelektroden und Ammoniumchlorid aus dem Kulturmedium durch Elektrolyse gebildet hatten. Diese Entdeckung ebnete den Weg für eine bis dahin völlig neue Klasse von Zytostatika. In weiteren Untersuchungen stellte sich cis-Diammindichloroplatin(II) als die eigentlich wirksame Substanz heraus<sup>2</sup>.

Nachdem 1968 Tierversuche vielversprechende Ergebnisse geliefert hatten, fanden 1971 erste klinische Studien statt und zeigten, dass diese Substanz, die heute als Cisplatin bekannt ist, eine ausgesprochene Antitumor-Aktivität besitzt<sup>2</sup>.

Cisplatin hielt schnell Einzug in viele Chemotherapieregime und wird heute häufig in der Therapie maligner Tumoren eingesetzt. Es findet besonders bei Hoden-, Ovarial-, Bronchial- und Zervixtumoren Anwendung<sup>3</sup>. Neben den zum Teil schweren

unerwünschten Wirkungen<sup>4</sup> führt das Auftreten von Resistenzen zu einer Einschränkung der Anwendung von Cisplatin<sup>5</sup>.

Daher startete bald die Suche nach weiteren Platinkomplexen, die durch geringere Toxizität bei verbesserter Wirksamkeit und breiterem Wirkungsspektrum die Chemotherapie mit Platinkomplexen verbessern sollten<sup>6</sup>.

Von den zahlreichen bisher synthetisierten und antitumoral wirksamen Platinkomplexen gelangten bisher nur zwei weitere Substanzen zur Zulassung.

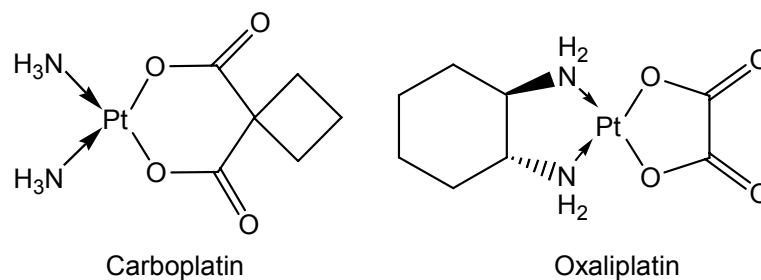


Abb. 1.2 Chemische Struktur von Carboplatin und Oxaliplatin

Carboplatin [cis-Diammin(1,1-cyclobutandicarboxylato)platin(II)] (Abb. 1.2) besitzt eine Cyclobutandicarboxylato-Abgangsgruppe. Diese bildet im Vergleich zu den Chloridliganden des Cisplatins einen wesentlich stabileren Chelatliganden, auf den die höhere Wasserlöslichkeit, aber auch die geringere Reaktivität des Carboplatins zurückzuführen ist. Trotz der dadurch benötigten höheren Dosen, besitzt Carboplatin weniger unerwünschte Wirkungen bei vergleichbarer antitumoraler Wirkung. Dies hat dazu geführt, dass es seit seiner Markteinführung 1986 rasch fester Bestandteil vieler Behandlungsregime wurde<sup>3</sup>.

Die Tatsache, dass Carboplatin das Wirkspektrum nicht erweitern konnte und eine Kreuzresistenz zu Cisplatin besteht, hat zur weiteren Entwicklung von Platinkomplexen geführt.

Der Austausch der Amminliganden durch einen Diaminocyclohexanring (DACH) und der Chloridliganden durch einen Oxalatliganden als Abgangsgruppe führte zu Oxaliplatin [[(1*R*, 2*R*)-1,2-Cyclohexandiamin-*N,N'*][oxalato(2-)-O,O']platin(II)] (Abb. 1.2). Diese Substanz zeigt keine Kreuzresistenz zu Cisplatin, besitzt ebenfalls eine verbesserte Wasserlöslichkeit und gute Verträglichkeit<sup>7,8</sup>. Oxaliplatin ist seit 1999 für die Behandlung des kolorektalen Karzinoms zugelassen.

Die Entwicklung neuer Platinkomplexe wird weiter fortgesetzt, und es befinden sich mehrere neue, z.T. auch per os verabreichbare Platinkomplexe in der klinischen Prüfung. Jedoch hat auch das schon seit vielen Jahren als Zytostatikum eingesetzte Cisplatin aufgrund seiner ausgeprägten antitumoralen Wirksamkeit immer noch eine große Bedeutung in der Therapie maligner Tumoren.

Trotz der breiten und langjährigen Erfahrung mit dieser Substanz ist der Wirkungsmechanismus noch nicht vollständig geklärt. Zudem sind die Mechanismen der auftretenden Resistenzen, die große Probleme in der Therapie bereiten, bis heute nicht geklärt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich maßgeblich mit der Wirkung von Cisplatin auf Tumorzellen, der Charakterisierung der Platinsensitivität und der Untersuchung von Resistenzmechanismen gegenüber Cisplatin. Die hier gewonnenen Erkenntnisse sollen einen Beitrag leisten zur Entwicklung von Strategien zur Resistenzüberwindung und Individualisierung platinhaltiger Chemotherapie.

## **1.2 Cisplatin**

Der zytotoxisch wirkende Platinkomplex Cisplatin stellt eine Metallkoordinationsverbindung dar und enthält Platin als Zentralatom in der Oxidationsstufe +2. Er weist als  $d^8$ -Pt(II)-Komplex eine quadratisch planare Geometrie auf und besitzt zwei Amminliganden und zwei Chloridliganden (Abb. 1.1). Cisplatin besitzt eine molare Masse von 300,0 g/mol und bildet als Feststoff gelbe Kristalle. Die Wasserlöslichkeit beträgt 2,53 mg/mL bei 25° C und die entstehende Lösung ist farblos.

### **1.2.1 Wirkungsmechanismus von Cisplatin**

#### **Bioaktivierung**

Cisplatin selbst ist ein relativ unreaktives Molekül und reagiert nicht direkt mit anderen Molekülen in biologischen Systemen. In wässriger Lösung bilden sich jedoch durch schrittweisen Austausch der Chloridliganden mit Wasser reaktive Mono- und Diaquakomplexe (Abb. 1.3)<sup>9</sup>.

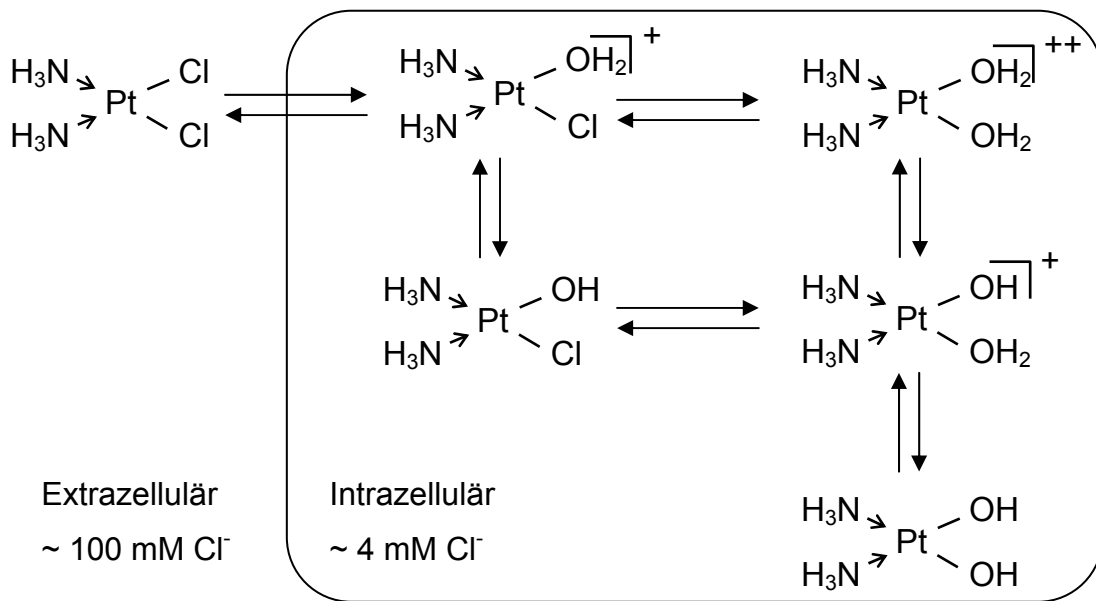


Abb. 1.3 Schematische Darstellung der Reaktionen von Cisplatin innerhalb der Zelle

Die Geschwindigkeit des Austauschs ist dabei abhängig von der Chloridionenkonzentration der Lösung. Die Aquakomplexe werden auch als „reaktives Cisplatin“ bezeichnet und sind für die antitumorale Wirkung aber auch für unerwünschte Wirkungen verantwortlich.

Cisplatin wird typischerweise intravenös verabreicht. Die extrazelluläre Chloridionenkonzentration ist relativ hoch (ca. 100 mM), so dass Cisplatin hauptsächlich in der stabilen, d.h. weniger reaktiven Dichloro-Form vorliegt. Intrazellulär beträgt die Chloridionenkonzentration ca. 4 mM, sodass sich nach Überwindung der Zellmembran rasch Aquakomplexe bilden können. Bevorzugte Reaktionspartner dieser reaktiven Spezies sind nukleophile Gruppen, wie sie in Nukleinsäuren, schwefelhaltigen Aminosäuren, Peptiden und Proteinen vorkommen. Cisplatin kann also mit einer Vielzahl in der Zelle vorkommender Makromoleküle Addukte bilden. Es ist jedoch unumstritten, dass seine zytotoxischen Eigenschaften hauptsächlich auf die Bildung von Platin-DNA-Addukten zurückzuführen sind<sup>10,11</sup>.

### Platin-DNA-Adduktbildung

Bevorzugter Angriffspunkt ist das N7 des Guanins oder Adenins aufgrund der hohen Nukleophilie des Imidazolrings. Eine Reaktion an N1 von Adenin oder N3 von Cytosin ist ebenfalls möglich (Strukturformeln s. Abb. 1.4).



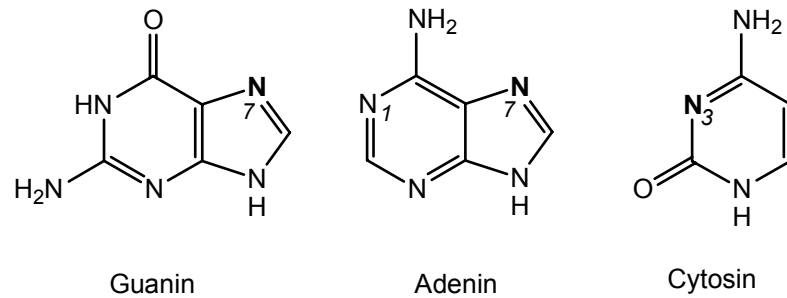


Abb. 1.4 Chemische Struktur von Guanin, Adenin und Cytosin

Aufgrund der bifunktionalen Struktur der Mono- und Diaquakomplexe sind diese in der Lage, zwei Nukleotide auf einem oder zwei DNA-Strängen miteinander zu vernetzen. Am häufigsten werden Addukte zwischen zwei auf einem Strang benachbarten Guanin-Basen gebildet (Pt-GG). Zu einem geringeren Teil treten auch Addukte zwischen benachbartem Guanin und Adenin (Pt-AG) sowie zwischen zwei durch eine oder mehrere Basen getrennten Guaninen (G-Pt-G) auf.

Liegen die Addukte auf einem Strang, spricht man von „*intrastrand crosslinks*“. Es können jedoch auch Addukte gebildet werden, die zwei Guanin-Basen auf komplementären Strängen verknüpfen.

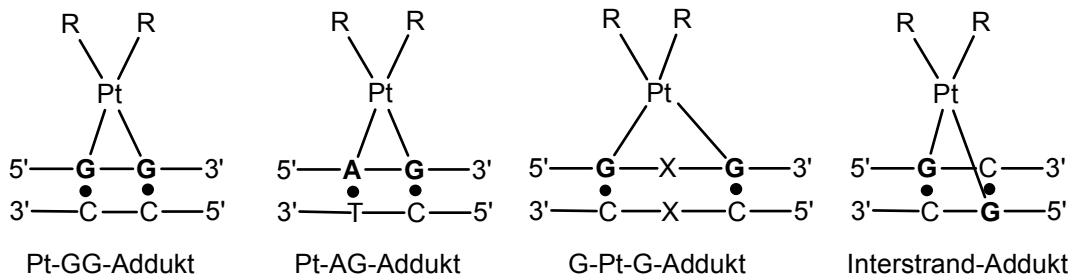


Abb. 1.5 Schematische Struktur der verschiedenen Platin-DNA-Addukte

Man spricht dann von „*interstrand crosslinks*“ (Abb. 1.5). Zudem findet man Monoaddukte als Vorstufen zu den bifunktionalen Addukten sowie Quervernetzungen zwischen DNA und Proteinen<sup>12</sup>.

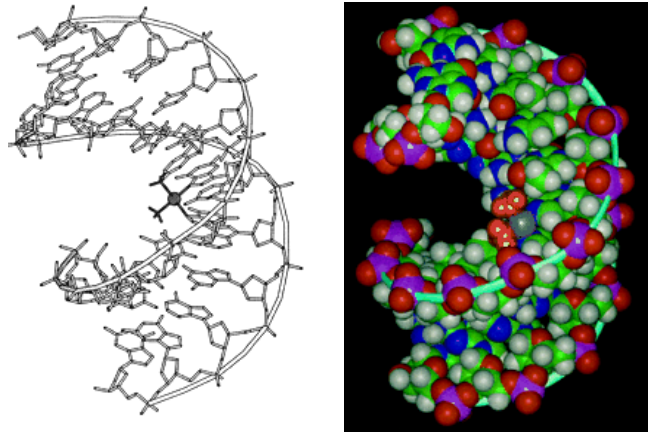


Abb. 1.6 Modelle von Cisplatin-GG-Addukten [Grün: Kohlenstoff, blau: Stickstoff, rot: Sauerstoff, weiß: Wasserstoff, magenta: Phosphor, grau: Platin, orange: Ammin-Stickstoffe mit den zugehörigen Wasserstoffen]<sup>13</sup>

Die Platin-DNA-Adduktbildung ist Hauptursache für die zytotoxische Wirkung von Cisplatin, da sie weitreichende strukturelle Veränderungen der DNA zur Folge hat. Die DNA-Platinierung führt zu den dargestellten Quervernetzungen und bewirkt somit eine Konformationsänderung der DNA (Abb. 1.6). Die räumliche Struktur der DNA ändert sich derart, dass sich die Helix um 76-80° entwindet und um 20-40° in Richtung der großen Furche abknickt<sup>14</sup>. Dies führt zu einer Destabilisierung der DNA und kann vermehrt Strangbrüche induzieren. Außerdem wird durch die Änderung der natürlichen Erkennungsstruktur die Replikation und Transkription gehemmt, was letztendlich zum Zellzyklusarrest und zur Apoptose führt. Der genaue Mechanismus, wie der zytotoxische Effekt vermittelt und die Apoptose eingeleitet wird, ist noch nicht bekannt. Die Vorgänge in einer Zelle nach Bildung von Platin-DNA-Addukten werden in Kap. 1.3 näher erläutert. Das Ausmaß der Platin-DNA-Adduktbildung hat v.a. bei Cisplatin einen hohen prädiktiven Wert im Hinblick auf das Tumoransprechen gezeigt<sup>15,16,17</sup> und gilt als zentraler Parameter bei der Charakterisierung der Platinsensitivität.

### 1.2.2 Wirksamkeit und klinische Bedeutung

Die Einführung von Cisplatin 1979 in die Therapie maligner Erkrankungen war ein großer Fortschritt für die Onkologie. Seine antitumorale Wirksamkeit führte zum Einsatz in der Therapie verschiedenster Tumoren wie Hoden-, Ovarial-, Zervix-, Endometrium-, Prostata-, Bronchial- und Plattenepithelkarzinomen sowie seltener bei Karzinomen im

Kopf- und Halsbereich sowie bei Melanomen und Sarkomen. Die Anwendung erfolgt meist in Kombination mit anderen Zytostatika<sup>3</sup>.

Der Einsatz von Cisplatin machte es möglich, die Heilungsraten bei Keimzelltumoren enorm zu steigern und die Prognosen signifikant zu verbessern. Vor der Therapie-einführung von Cisplatin lag die Überlebenswahrscheinlichkeit nur bei ca. 45 %. Heute wird Cisplatin z.B. standardmäßig bei Hodenkarzinom zusammen mit Bleomycin und Etoposid (BEP-Schema) eingesetzt. Dieses Chemotherapie-Schema führt bei über 90 % der Patienten zu einer kompletten Remission des Tumors<sup>18,19</sup>.

Die Einführung von Cisplatin in die Therapie des Ovarialkarzinoms in Kombination mit der ursprünglich ausschließlichen Behandlung mit Alkylantien stellte ebenfalls einen wesentlichen Fortschritt da. Die Prognose des Ovarialkarzinoms ist insgesamt schlechter als beim Hodenkarzinom, jedoch konnte die 5-Jahres-Überlebensrate signifikant verlängert werden<sup>3</sup>. Tab. 1.1 zeigt Beispiele für häufig eingesetzte cisplatin-haltige Chemotherapieregime.

Tab. 1.1 Cisplatinhaltige Chemotherapieregime<sup>3</sup>

<b>Tumorart</b>	<b>Chemotherapieregime</b>
Hodenkarzinom (Teratom oder Seminom)	<b>BEP</b> Bleomycin 30 mg Tag 2 Etoposid 120 mg/m <sup>2</sup> /d Tag 1-3 Cisplatin 50 mg/m <sup>2</sup> /d Tag 1-2 alle 3 Wochen, 4 Zyklen
Ovarialkarzinom	Cisplatin 75 mg/m <sup>2</sup> Tag 1 Paclitaxel 135 mg/m <sup>2</sup> Tag 1 alle 3 Wochen, 6 Zyklen
NSCLC	<b>MIC</b> Mitomycin C 6 mg/m <sup>2</sup> Tag 1 Ifosfamid 3 g/m <sup>2</sup> Tag 1 Cisplatin 50 mg/m <sup>2</sup> Tag 1 alle 3 Wochen, 4-6 Zyklen
Kopf- und Nackenkarzinom	Cisplatin 100 mg/m <sup>2</sup> Tag 1 Fluorouracil 1000 mg/m <sup>2</sup> /d, Tag 1-4 alle 3 Wochen, 6 Zyklen

Tab. 1.1 Cisplatinhaltige Chemotherapieregime (Fortsetzung)

Blasenkarzinom	<b>MVAC</b> Methotrexat 30 mg/m <sup>2</sup> /d Tag 1, 15 und 22 Vinblastin 3 mg/m <sup>2</sup> /d Tag 2, 15 und 22 Doxorubicin 30 mg/m <sup>2</sup> Tag 2 Cisplatin 70 mg/m <sup>2</sup> Tag 2 alle 4 Wochen, 4-6 Zyklen
Zervixkarzinom	<b>BIP</b> Bleomycin 30 mg Tag 1 Ifosfamid 5 g/m <sup>2</sup> Tag 2 Cisplatin 50 mg/m <sup>2</sup> Tag 2 alle 3 Wochen, 4-6 Zyklen
Magenkarzinom	<b>ECF</b> Epirubicin 50 mg/m <sup>2</sup> Tag 1 Cisplatin 60 mg/m <sup>2</sup> Tag 1 Fluorouracil 200 mg/m <sup>2</sup> /d Tag 1-21 alle 3 Wochen, 6-8 Zyklen

Die zum Teil schweren unerwünschten Wirkungen schränken den Einsatz von Cisplatin ein. An erster Stelle ist hier die Nephrotoxizität zu nennen, die dosislimitierend ist. Ihr kann durch eine Hydratationstherapie vor und nach der Chemotherapie entgegen gewirkt werden, jedoch bleibt das Risiko einer Nierenschädigung bestehen. Eine weitere unerwünschte Wirkung ist die oft irreversible Ototoxizität, die durch Zerstörung von Zellen in der Innenohrschnecke zu Tinnitus oder Hörverlust führen kann und besonders für junge Patienten problematisch ist. Weiterhin verursacht Cisplatin nach Gabe von hohen Dosen oder über längeren Zeitraum eine periphere Neuropathie mit kumulativem Charakter, welche – wenn auch hauptsächlich sensorischer Natur – zu motorischer Beeinträchtigung führen kann. Ein großes Problem in der Therapie ist, dass Cisplatin in hohem Maße Übelkeit und Erbrechen induziert. Mit der Einführung von 5-HT<sub>3</sub>-Antagonisten konnte diese unerwünschte Wirkung jedoch stark reduziert werden<sup>20</sup>. Weitere unerwünschte Wirkungen, die durch die toxische Wirkung auf schnell proliferierende Zellen zustande kommen, sind z.B. Knochenmarksdepression, Haar- ausfall und Schädigung des Magen-Darm-Traktes.

---

Neben Cisplatin ist auch Carboplatin von großer Bedeutung in der Therapie maligner Tumoren. Carboplatin ist weniger reaktiv als Cisplatin und weist somit auch weniger unerwünschte Wirkungen auf. Das Wirkungsspektrum der beiden Platinkomplexe ist ähnlich, jedoch nicht identisch. Carboplatin konnte Cisplatin insbesondere wegen der besseren Verträglichkeit in vielen – aber nicht allen – Therapieregimen ersetzen und ist der einzige Platinkomplex, der in der Hochdosis-Chemotherapie einsetzbar ist<sup>3</sup>.

Der dritte zugelassene Platinkomplex – Oxaliplatin – findet Anwendung in der Therapie des kolorektalen Karzinoms, wird momentan jedoch auch für die Anwendung bei anderen Tumorarten getestet, z.B. zur Behandlung des Ovarialkarzinoms<sup>21</sup>.

## 1.3 Platinsensitivität und -resistenz

### 1.3.1 Zelluläre Prozesse nach Bildung von Platin-DNA-Addukten

Wie in Kap. 1.2.1 erläutert, werden die zytotoxischen Eigenschaften von Cisplatin hauptsächlich auf die Bildung von Platin-DNA-Addukten zurückgeführt, welche weitreichende Folgen für die Zelle haben. Die Schädigung der DNA und die damit verbundene strukturelle Veränderung zieht verschiedene Prozesse nach sich, die einerseits für den zytotoxischen Effekt, andererseits aber auch für die Resistenzentwicklung eine wichtige Rolle spielen (s. Abb. 1.7).

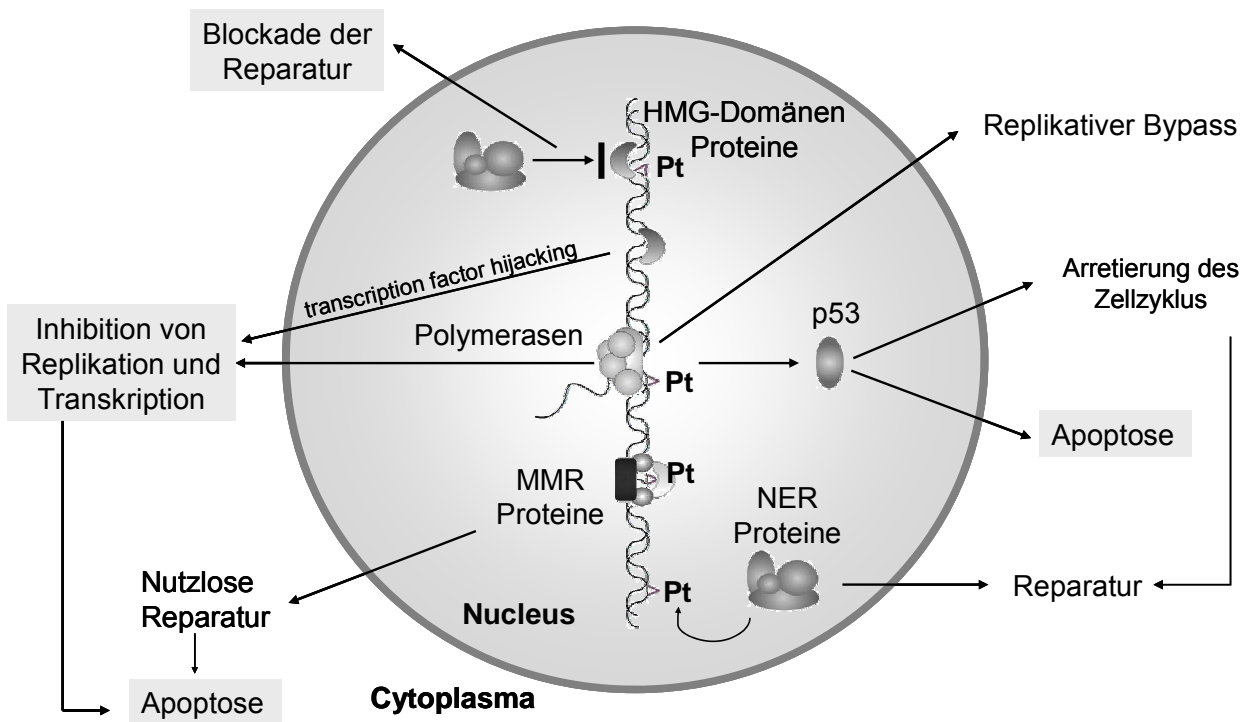


Abb. 1.7 Prozesse nach Bildung von Platin-DNA-Addukten im Zellkern<sup>22</sup>

#### Hemmung der DNA-Synthese

Die Ausbildung von Platin-DNA-Addukten verhindert, dass sich DNA-Polymerasen in gewohnter Weise an die DNA anlagern können. Grund dafür ist die strukturelle Veränderung der Helix. Dies führt zur Hemmung der DNA-Synthese im Zellkern<sup>22</sup>.

## Reparaturmechanismen

Jede Zelle versucht, einen in ihrem Erbgut entstandenen Schaden an der DNA zu reparieren. Es gibt verschiedene Reparaturmechanismen, aber die im Zellkern gebildeten Platin-DNA-Addukte werden hauptsächlich durch das Nukleotid-Exzisions-Reparatur-(NER)-System repariert<sup>23</sup>, welches auch verantwortlich für die Reparatur UV-induzierter Schäden ist. Die menschliche NER besteht aus sechs Reparaturfaktoren, die Schäden der DNA erkennen und diese durch Herausschneiden von Oligonukleotidsträngen von 22 - 32 Nukleotiden Länge entfernen. Anschließend werden die Lücken durch Neusynthese der DNA gefüllt und die Enden durch Ligasen verbunden. Die Zellen sind aber dennoch nur unzureichend in der Lage, die Schäden zu beseitigen. Diese Unfähigkeit ist für den Erfolg von Cisplatin als Tumorthapeutikum von Bedeutung. Dies wird dadurch belegt, dass Zelllinien von Patienten mit Xeroderma Pigmentosum (einer Erbkrankheit, die auf einem genetischen Defekt im NER-System beruht) hoch sensitiv gegenüber Cisplatin sind<sup>24</sup>.

Ursache einer unzureichenden Reparatur sind eine Gruppe zellulärer Proteine, die an die Addukte binden, da diese zufällig in der Struktur ihrem natürlichen Bindungspartner ähneln. Bei diesen HMG-Proteinen (Proteine mit einer high mobility group Domäne) handelt es sich um eine Gruppe von Proteinen, die häufiger Bestandteil von Chromosomen sind und dadurch definiert sind, dass sie alle strukturell ähnlich sind und an DNA binden können<sup>25</sup>.

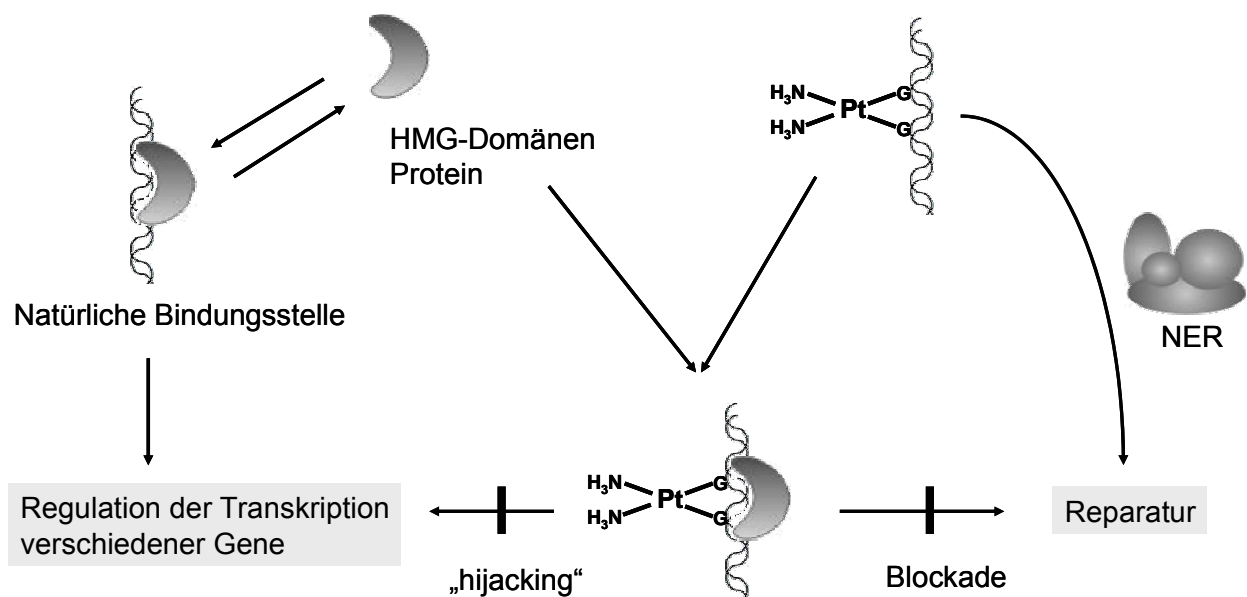


Abb. 1.8 Rolle von Proteinen mit „high mobility group“-Domänen bei der zellulären Antwort auf Platin-DNA-Addukte<sup>22</sup>

Ihre normale Funktion ist noch unklar, jedoch vermutet man, dass sie eine Rolle beim Aufbau der Nukleinsäureketten spielen. Binden HMG-Proteine an Platin-DNA-Addukte, so kann die Reparatur verhindert werden, da die Reparatur-Faktoren (z.B. des NER-Systems) den Schaden nicht mehr erkennen (s. Abb. 1.8)<sup>22,26</sup>. Eine vollständige Verhinderung der Reparatur der Addukte ist jedoch nicht möglich.

### **Hemmung der Transkription**

Einige HMG-Proteine besitzen eine gleich hohe, teilweise sogar höhere Affinität zur platinieren DNA als zu ihrer natürlichen Bindungsstelle. Dazu gehören auch Transkriptionsfaktoren für die RNA-Synthese. Diese können durch Platin-DNA-Addukte abgefangen werden und es kommt zu einer Hemmung der Transkription. Man spricht vom so genannten „transcription factor hijacking“ (vgl. Abb. 1.8)<sup>26</sup>.

Ein HMG-Protein, das an Platin-DNA-Addukte bindet, ist UBF (upstream binding faktor). UBF ist ein Transkriptionsfaktor der RNA-Polymerase-I, welcher an einen Promotor der ribosomalen DNA (rDNA) bindet. Demnach kann die RNA-Polymerase-I keine Transkription initiieren, wenn UBF nicht an den Promotor bindet. Die Affinität von UBF zum rDNA-Promotor ist ungefähr gleich wie zum Platin-DNA-Addukt, so dass UBF vermutlich durch den Cisplatin-induzierten DNA Schaden abgefangen wird.

Da Cisplatin- oder UV-induzierte Schäden der rDNA signifikant schlechter repariert werden als Schäden an Genen, die von der RNA-Polymerase-II transkribiert werden, erwartet man bei der rDNA mehr Schäden als an genomischer DNA. Außerdem sind eine Reihe von weiteren HMG-Proteinen Transkriptionsfaktoren der RNA-Polymerase-I, sodass eine Häufung von Schäden an der rDNA zu einer weiteren Hemmung der Transkription von ribosomaler RNA (rRNA) beiträgt<sup>27</sup>.

Diese Blockade der rRNA könnte entscheidende Bedeutung bei der Wirkung von Cisplatin haben und der Grund dafür sein, dass Cisplatin besonders bei sich schnell teilenden Krebszellen und Zellen mit einer hohen Proteinsynthese zytotoxisch wirkt, da die rRNA-Synthese in proliferierenden und metabolisch aktiven Zellen erhöht ist. Dies könnte sogar erklären, warum als unerwünschte Wirkung bei der Therapie mit Cisplatin Neuropathie auftritt, da Neuronen eine hohe Proteinsynthese aufweisen<sup>24,28</sup>.

Der Mechanismus, wie die Hemmung der DNA-Synthese, die Reparaturblockade und die Hemmung der Transkription letztendlich zum Zelltod führen, ist noch unklar.



## Mismatch-Reparatur und replikativer Bypass

Gesichert ist die direkte Rolle der Mismatch-Reparatur-(MMR)-Proteine bei der Signaltransduktion vom cisplatininduzierten DNA-Schaden zur apoptotischen Antwort der Zelle. Die Mismatch-Reparatur findet direkt nach der Replikation statt und korrigiert Basenfehlpaarungen. Dabei dient der elterliche Strang, der an seinem Methylierungsmuster erkannt wird, als Matrize für die Reparatur des neu synthetisierten Strangs. Für die Zytotoxizität von Cisplatin ist das Vorhandensein dieses Mechanismus essentiell; fehlt er oder ist er defekt, kommt es zur Resistenz gegenüber der Substanz. Diese ungewöhnliche Tatsache, dass der Defekt eines Reparaturmechanismus und nicht seine verstärkte Aktivität die Toleranz gegenüber einem Zytostatikum erhöht, kann mit dem Teufelskreismodell nach *Goldmacher et al.* erklärt werden (Abb. 1.9)<sup>26</sup>.

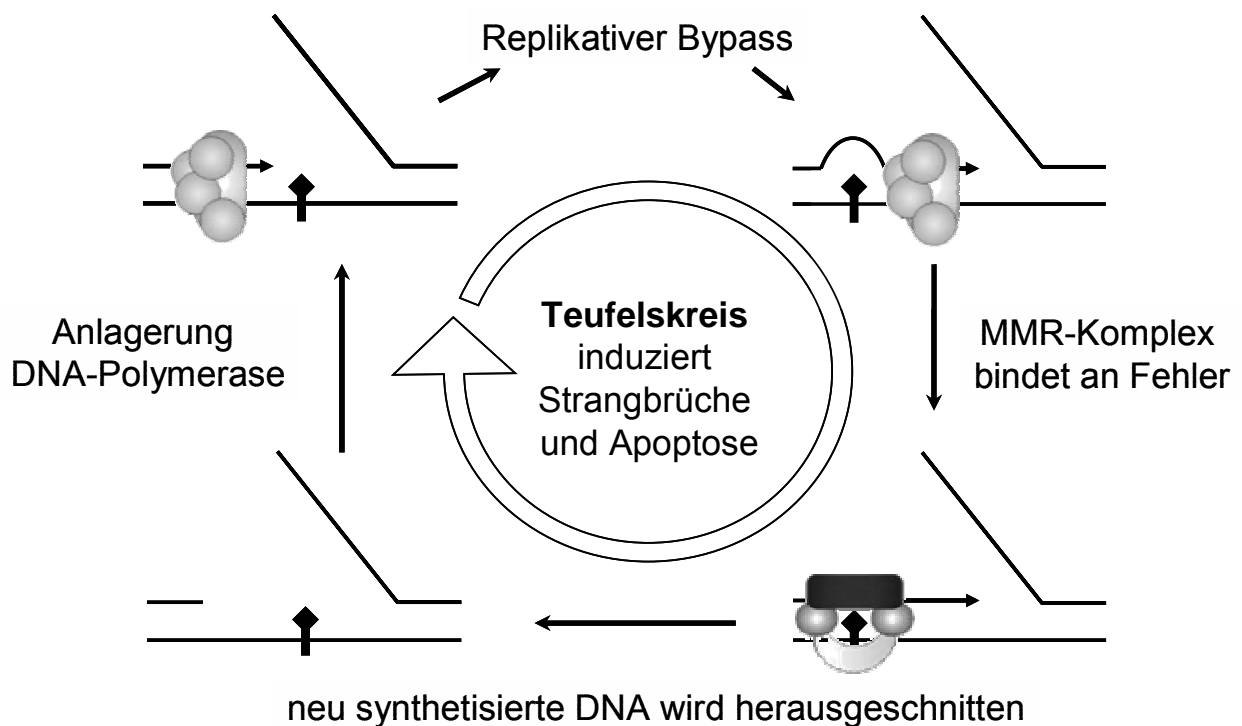


Abb. 1.9 Zusammenhang zwischen Mismatch-Reparatur und Cisplatinwirkung: Darstellung des Teufelskreismodells nach Goldmacher et al.<sup>26</sup>

Obwohl die DNA-Replikation durch Anwesenheit platininduzierter DNA-Schäden gehemmt wird, können einige Platin-DNA-Addukte durch die DNA-Polymerase umgangen werden, bevor die Replikation vollständig stoppt. Eine Folge dieser transläsionalen DNA-Synthese – auch replikativer Bypass genannt – ist der zufällige Einbau von Nucleotiden gegenüber von einem platinieren Nucleotid. Folglich beinhaltet die

neue Helix einen Mismatch, der vom MMR-Mechanismus erkannt wird. Die Bindung von MMR-Proteinen an die DNA verhindert, dass das NER-System aktiv werden und den Schaden reparieren kann. Im Gegensatz zum NER, das zellzyklusunabhängig arbeitet, ist das MMR-System bevorzugt während der postreplikativen Phase aktiv, da hier die Mismatches in der neu synthetisierten DNA auftreten. Anschließend wird durch den MMR der neu synthetisierte DNA-Strang herausgeschnitten, während der Schaden auf dem elterlichen DNA-Strang erhalten bleibt. Das DNA-Addukt wird erneut „überrepliziert“, die Lücke wird wieder geschlossen, und der Kreislauf beginnt von vorn. Die Reparaturversuche sind somit nutzlos und generieren durch den fortlaufenden Teufelskreis DNA-Lücken und Strangbrüche, die schließlich zum Zelltod führen. Somit sind schnell proliferierende Zellen besonders anfällig für nutzlose Reparaturversuche, die den Zelltod auslösen können<sup>26</sup>.

### **Einleitung von Zellzyklusarrest und Apoptose**

Ein wichtiger Aspekt ist, dass Cisplatin Krebszellen tötet, indem es einen Zellzyklus-Arrest in der G<sub>2</sub>-Phase und Apoptose einleitet. Man vermutet, dass Cisplatin zwei parallele „death-response“ Wege induzieren kann, einer abhängig von p53 und der andere von p73. Beides sind Proteine, die Zellzyklusarrest oder Apoptose als Antwort auf einen DNA-Schaden einleiten können. Eine Arretierung des Zellzyklus ermöglicht der Zelle, die entstandenen Schäden zu reparieren. Ist dies nicht möglich oder ist der Schaden zu groß, wird die Apoptose eingeleitet. Der genaue Mechanismus dieser Prozesse ist jedoch noch ungeklärt<sup>24</sup>.

### **1.3.2 Resistenzmechanismen**

Ein großes Problem bei der Behandlung maligner Erkrankungen mit Cisplatin ist die Chemoresistenz. Unter Chemoresistenz versteht man die verminderte Empfindlichkeit einer Zelle gegenüber einem Zytostatikum. Rund die Hälfte aller malignen Tumore spricht nicht auf eine zytostatische Therapie an. Man bezeichnet dies als primäre oder intrinsische Resistenz. Ein gutes Drittel der zunächst ansprechenden Tumore entwickelt im Laufe der medikamentösen Therapie eine so genannte sekundäre Resistenz<sup>29</sup>. Eine Fortsetzung der Therapie mit anderen, noch nicht angewendeten Zytostatika ist dann häufig auch erfolglos. In diesen Tumoren haben sich Zellen in ihrem Wachstum durchgesetzt, die bestimmte Mechanismen entwickelt haben, um sich dem Zytostatikum bzw.

dessen Auswirkungen zu entziehen. In diesem Abschnitt sollen einige dieser Mechanismen näher vorgestellt werden, die für die Ausbildung einer Resistenz gegenüber Cisplatin eine Rolle spielen können.

Dazu gehören:

- Veränderungen im Uptake oder Efflux
- Detoxifizierung durch Glutathion oder Metallothionein
- eine gesteigerte Reparatur der DNA
- eine gesteigerte Toleranz gegenüber platinierter DNA.

Bevor Cisplatin in den Nukleus gelangt, an die DNA binden und somit seinen zytotoxischen Effekt auslösen kann, muss es in die Zelle aufgenommen werden und in der Zelle akkumulieren. Veränderungen in der Akkumulation und Detoxifizierung im Zytoplasma tragen dazu bei, dass Tumorzellen resistent gegenüber Cisplatin werden.

### **Uptake und Efflux**

In cisplatinresistenten Zelllinien wird häufig eine verringerte Akkumulation beobachtet. Der Mechanismus ist unklar. Entweder ist ein verringerter Uptake, ein verstärkter Efflux oder beides dafür verantwortlich.

Der Transport von Platinkomplexen in die Tumorzelle erfolgt sowohl passiv durch Diffusion als auch aktiv durch Transportproteine. Obwohl Platinkomplexe schon seit über 20 Jahren in der Krebs-Chemotherapie erfolgreich eingesetzt werden, ist erst seit Kurzem bekannt, dass Platinkomplexe mit Hilfe von Kupfertransportproteinen in die Zelle aufgenommen (CTR1) und von dort wieder herausgeschleust (ATP7A, ATP7B) werden<sup>30</sup>. Diese Transporter sind normalerweise für die Aufrechterhaltung der Kupferhomöostase verantwortlich (s. Abb. 1.10)<sup>31</sup>. Über CTR1 wird Kupfer in die Zelle aufgenommen und dann über drei verschiedene Chaperone weiter entweder zu den Mitochondrien, zum Enzym Superoxyd-Dismutase (SOD) oder zum Trans-Golgi-Apparat transportiert. Hier sind zwei ATPasen (ATP7A und ATP7B) lokalisiert, die die Kupferionen unter Verbrauch von Energie in den Golgi-Apparat pumpen, wo sie an kupferabhängige Enzyme gebunden und über Vesikel aus der Zelle hinausgeschleust werden.

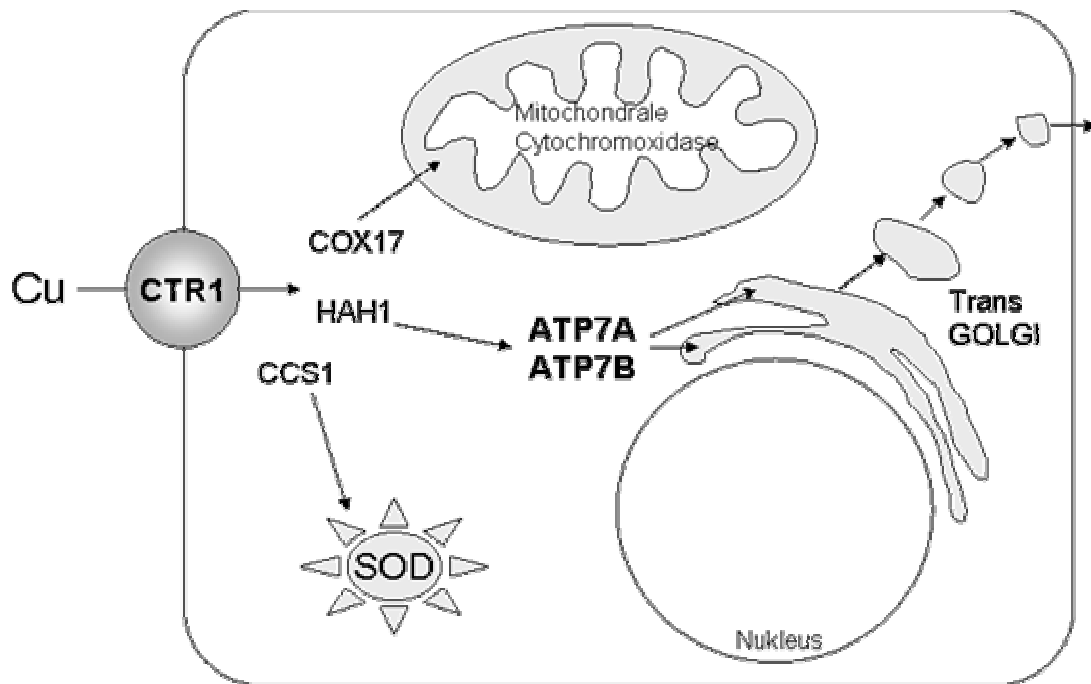


Abb. 1.10 Schematische Darstellung der Kupferhomöostase<sup>30</sup>

Ein verringerter Uptake von Platinkomplexen in die Zelle und ein gesteigerter Efflux führen zu einer geringeren Konzentration an zytotoxisch aktiver Substanz in der Zelle und zu einer geringeren DNA-Platinierung. Eine Up- bzw. Downregulation der beteiligten Transportproteine kann somit wesentlich zur Resistenzentwicklung beitragen<sup>32</sup>. CTR1 kann sowohl Kupfer als auch Cisplatin transportieren und somit die Cisplatinempfindlichkeit beeinflussen. Vieles deutet darauf hin, dass Kupfer die Cisplatinempfindlichkeit kompetitiv hemmt und dass Cisplatin – ebenso wie Kupfer – zu einer Degradierung und Internalisierung des CTR1-Transporters führen kann<sup>33,34</sup>. Eine Überexpression des Transporters ATP7B bzw. ein Ausschalten von CTR1 konnte mit Cisplatinresistenz in Verbindung gebracht werden<sup>35,36</sup>. Somit gibt es inzwischen zahlreiche Hinweise auf eine wichtige Rolle von CTR1 beim Uptake und von ATP7A und ATP7B beim Efflux von Platinkomplexen (siehe auch Abb. 1.11).

Neben den genannten Transportproteinen ist auch MRP2 (MDR-assoziieres Protein 2) von Bedeutung. Er wurde als zweites Mitglied dieser Familie von Membrantransportern identifiziert und erhielt daher die Bezeichnung MRP2. Es wird auch als cMOAT (= canalicular multispecific organic anion transporter) bezeichnet. Durch die intrazelluläre Reaktion von Platinkomplexen mit Glutathion (GSH) werden inaktive Platin-Glutathion-Konjugate gebildet, welche durch MRP2 aktiv aus der Zelle heraus transportiert werden (s. Abb. 1.11)<sup>37,38</sup>. Der MRP2-Transporter kann daher zu einer Resistenzentwicklung gegen Platinkomplexe beitragen, insbesondere auch deshalb,

weil es Hinweise darauf gibt, dass MRP2 durch Cisplatin induziert werden kann<sup>39</sup> und sogar ein Zusammenhang zwischen der Überexpression von MRP2 und einer verminderten Bildung von Platin-DNA-Addukten in Melanomzellen gezeigt werden konnte<sup>40</sup>. Es gibt Hinweise dafür, dass neben MRP2 auch MRP6 beim Efflux von Platin eine Rolle spielt<sup>41</sup>.

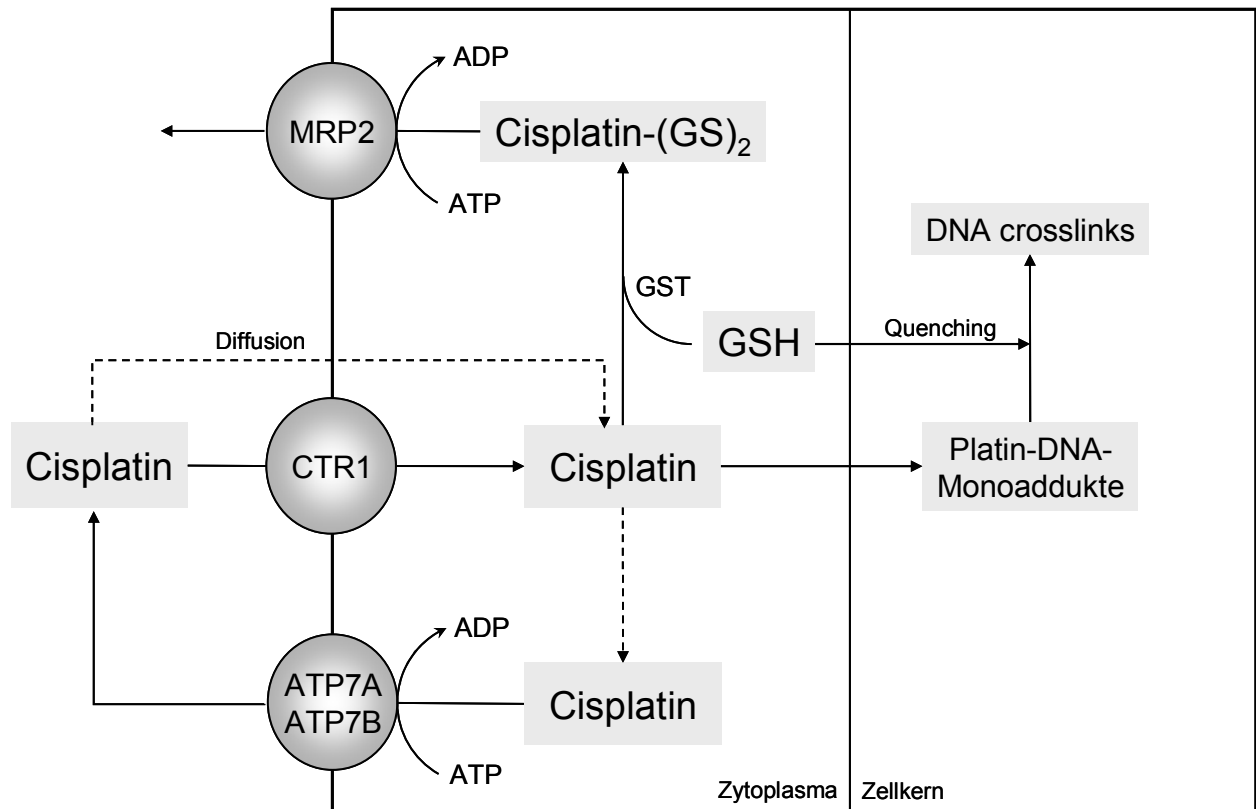


Abb. 1.11 Schematische Illustration der Einflussfaktoren auf die Cisplatinempfindlichkeit vor Bildung der Platin-DNA-Quervernetzungen (crosslinks)

### Glutathion und Metallothionein

Nachdem Cisplatin in die Zelle aufgenommen wurde, kann es mit vielen anderen Molekülen außer der DNA interagieren. Schwefelhaltige Aminosäuren und Proteine sind aufgrund der nukleophilen SH-Gruppen bevorzugte Reaktionspartner. Eine besondere Rolle spielen die beiden SH-haltigen Moleküle Glutathion (GSH) und Metallothionein (MT).

Glutathion ist ein Tripeptid und spielt eine wichtige Rolle bei Entgiftungsprozessen der Zelle von z.B. reaktiven Sauerstoffspezies und diversen Schwermetallen.

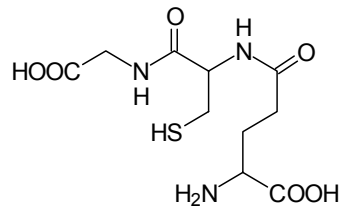


Abb. 1.12 Chemische Struktur von Glutathion (GSH)

GSH kann freies Cisplatin abfangen, so dass dieses nicht mehr seine zytotoxische Wirkung entfalten kann. Diese Konjugat-Bildung wird durch das Enzym Glutathion-S-Transferase (GST) vermittelt. Es bildet sich ein Cisplatin-GS-Komplex im Verhältnis 1:2, welcher dann durch MRP2 aus der Zelle eliminiert werden kann<sup>40</sup>.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass Glutathion mit Platin-DNA-Monoaddukten reagieren kann und somit die Ausbildung von DNA crosslinks verhindert; man spricht vom so genannten *Quenching* (vgl. Abb. 1.11)<sup>43</sup>.

Glutathion scheint auch eine Rolle bei der Reparatur von DNA-Schäden zu spielen, da es funktionelle Reparaturenzyme und den Desoxynukleotid-Triphosphat-Pool – wichtig für die DNA-Reparatur – unterstützt und aufrechterhält<sup>42</sup>.

Diese Eigenschaften führen dazu, dass cisplatinresistente Zellen häufig erhöhte Glutathionkonzentrationen zeigen<sup>43,44,45</sup>. Chronische Exposition mit steigenden Cisplatinkonzentrationen kann zu einer andauernden Erhöhung der Glutathionkonzentrationen führen. Die Hemmung der Synthese von Glutathion mit Buthionin-sulfoximin (BSO) kann die Resistenz aufheben und die Sensitivität der parentalen Zellen steigern<sup>46</sup>. Es gibt jedoch auch andere Studien, die nur einen geringeren oder keinen Effekt zeigen<sup>47</sup>. Eine wichtige Rolle als Resistenzmechanismus spielt auch die Überexpression von GST<sup>48</sup>, weil dadurch die Inaktivierung von Cisplatin beschleunigt wird. Eine Tumorzelle kann sich also durch Erhöhung ihrer intrazellulären Glutathionkonzentration bzw. durch Überexpression von GST vor der Wirkung von Cisplatin schützen.

Metallothionein ist ein kleines Protein (61-62 AS) mit 20 Cystein-Resten. Jedes Molekül kann zehn Platinatome binden. Metallothionein spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Entgiftung von Schwermetallen. Auf Metallothionein hat ein Selektionsdruck mit Cisplatin oft keinen Effekt, jedoch zeigen Zellen, die mit Schwermetallen selektiert

wurden, Kreuzresistenz gegenüber Cisplatin. Die Bedeutung von Metallothionein bei der Platinsensitivität ist umstritten<sup>49,50</sup>.

Die bisher dargestellten Resistenzmechanismen treten auf, bevor Cisplatin an die DNA gebunden hat. Es gibt jedoch eine Reihe von Möglichkeiten für die Zelle, auch nach der Platin-DNA-Adduktbildung der zytotoxischen Wirkung entgegenzusteuern oder diese sogar zu tolerieren.

### **DNA-Reparatur**

Die in Kap. 1.3.1 beschriebenen Prozesse nach Bildung von Platin-DNA-Addukten verdeutlichen, dass eine gesteigerte bzw. veränderte DNA-Reparatur großen Einfluss auf die Resistenzentwicklung haben kann. Platin-DNA-Addukte werden hauptsächlich durch Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) repariert und die Unfähigkeit der Zelle, diese Schäden komplett zu beseitigen, ist wichtig für die Wirkung von Cisplatin. Dementsprechend ist NER ein Hauptmechanismus der Platinresistenz. Zellen mit einem defekten NER-System zeigen eine Hypersensitivität gegenüber Cisplatin<sup>51</sup>, während sich cisplatinresistente Zellen durch eine verstärkte Expression von NER-Proteinen wie ERCC1 und XPA auszeichnen<sup>52,53,54</sup>. Es wurde gezeigt, dass NER wahrscheinlich nicht zwischen Platin-DNA-Addukten mit unterschiedlichen Neutralliganden (wie z.B. Cisplatin und Oxaliplatin) unterscheidet<sup>26</sup>. Somit spielt NER eine wichtige Rolle bei der Resistenz gegenüber platinhaltigen Chemotherapeutika generell und es scheint nicht wahrscheinlich, dass NER eine signifikante Rolle bei der neutralligandspezifischen Resistenz spielt. Je schneller und effizienter eine Zelle gebildete Platin-DNA-Addukte entfernen kann, desto höher ist ihre Überlebenswahrscheinlichkeit. Gesteigerte DNA-Reparatur tritt bei Selektion früh und andauernd auf. Erst um höhere Resistenzgrade zu erreichen, scheint die Zelle andere Mechanismen zu aktivieren<sup>55</sup>.

### **Toleranz gegenüber platinierter DNA**

Auch Veränderungen im MMR-System können zur Cisplatinresistenz beitragen. Das Teufelskreis-Modell nach *Goldmacher et al.* (Abb. 1.9) schlägt vor, dass replikativer Bypass bzw. DNA-Synthese über den Schaden hinweg, gefolgt von einer Erkennung und Entfernung des neu synthetisierten Stranges durch MMR, Lücken oder Strangbrüche verursacht, die den Zelltod induzieren. Verlust von MMR-Aktivität kann also zur Cisplatinresistenz beitragen, da so eine Vervollständigung der Replikation nach replikativem Bypass über den Schaden möglich wird. Die gebildeten Platin-DNA-

Addukte werden also von der Zelle besser toleriert. Eine Inaktivierung der MMR-Proteine führt außerdem zu einer effizienteren Reparatur durch NER und zu einer erhöhten Mutationsrate, da Mismatch-Paarungen nicht mehr erkannt werden. Übereinstimmend damit konnte bei einer cisplatinresistenten Zelllinie ein Defekt in der strangspezifischen Mismatch-Reparatur und ein starker Anstieg von Mikrosatelliteninstabilität festgestellt werden. Die durch das MMR-System vermittelten Signaltransduktionewege, die zum Zellzyklusarrest oder zur Apoptose führen, können bei fehlender Mismatch-Reparatur nicht mehr aktiviert werden<sup>56,57</sup>.

Defekte im MMR treten im Zusammenhang mit Cisplatin- und Carboplatinresistenz auf, nicht jedoch bei Oxaliplatin. Im Gegensatz zu Cisplatin hängt die zytotoxische Wirkung von Oxaliplatin nicht von einem intakten MMR-System ab<sup>58</sup>.

Die Schädigung von Genen, die am Apoptose-Weg beteiligt sind, trägt ebenfalls dazu bei, dass DNA-Schäden toleriert werden und eine Zelle resistent gegen Cisplatin wird. Jede Veränderung in der Expression von Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen – wie z.B. p53 – beeinflusst die Sensitivität gegenüber Cisplatin. Das p53-Gen codiert ein Protein, das einen Hauptkontrollpunkt im Zellzyklus darstellt. Es reagiert auf geschädigte DNA, indem es die Zelle entweder in die Apoptose schickt oder einen Zellzyklus-Arrest leitet, sodass die Zelle versuchen kann, den Schaden zu reparieren. Der p53-Status kann daher eine wichtige Rolle bei der Resistenzentwicklung spielen<sup>59,55</sup>.

Es können also viele verschiedene Resistenzmechanismen eine Rolle spielen und mehr als ein Mechanismus kann bei der gleichen Zelllinie auftreten, wenn sie *in vitro* selektiert wurde. Neben Veränderungen in den Transportproteinen könnte zelluläre Resistenz gegenüber Cisplatin durch eine dynamische Konkurrenz zwischen Proteinen, die DNA reparieren, mit der Reparatur interferieren oder Apoptose auslösen, hervorgerufen werden.

All diese Veränderungen können Teil einer komplizierten, miteinander zusammenhängenden und mannigfaltigen Antwort auf eine Cisplatin-Selektion sein. Welche dieser biochemischen Veränderungen letztendlich entscheidend sind, hängt von dem Zelltyp ab und von den Bedingungen, unter denen die Selektion stattgefunden hat. Besonders wichtig ist, dass sich die Entwicklung eines Tumors deutlich von der Entwicklung von Tumorzellen in Zellkultur unterscheidet. Die Bedingungen in einem Tumor und die dort auftretenden Cisplatinkonzentrationen sind nur schwer *in vitro* zu simulieren, sodass



sich die cisplatininduzierten Resistenzmechanismen in Tumor und Zellkultur unterscheiden können.

### 1.3.3 Klinische Bedeutung

Am deutlichsten wird das Problem der Resistenzentwicklung am Beispiel des Ovarialkarzinoms. Mit einer platinhaltigen Chemotherapie erhält man initiale Ansprechraten bis zu 70 %. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt jedoch nur bei 15 - 20 %. Ein Großteil der Patientinnen erleidet ein Rezidiv und spricht aufgrund von erworbener Resistenz nicht mehr auf eine Therapie mit Cisplatin oder Carboplatin an<sup>3</sup>.

Die im vorherigen Kapitel dargestellten Resistenzmechanismen sind vornehmlich auf zellulärer Ebene zu beobachten, jedoch können sie auch von klinischer Bedeutung sein. Mehrere Studien deuten darauf hin, dass die Expression von ATP7A und ATP7B bei einer Reihe von Tumoren von prognostischem Wert sein könnte<sup>60,61,62</sup>. Wie auch in Kap. 1.3.2 dargestellt, gibt es inzwischen zahlreiche Hinweise auf eine wichtige Rolle von CTR1 beim Uptake und von ATP7A und ATP7B beim Efflux von Platinkomplexen, die damit potentielle Targets für Strategien zur Resistenzüberwindung darstellen. Ein solches Target könnte auch Glutathion sein, wie verschiedene Studien zeigen<sup>63,64,65</sup>. In diesen Studien wird jedoch deutlich, dass für klinische Fragestellungen die Expression der GST wichtig sein könnte, da sie auch prognostischen Wert haben könnte. Dahingegen ist die klinische Bedeutung von Metallothionein umstritten<sup>50</sup>.

Der Status der Reparaturenzyme, der auf zellulärer Ebene eine große Rolle bei der Resistenzentwicklung spielt, kann ebenfalls von klinischer Bedeutung sein. Hohe Level an mRNA von ERCC1 in Tumorgewebe von unvorbehandelten Patientinnen mit Ovarialkarzinom konnte mit schlechtem Ansprechen auf eine platinhaltige Chemotherapie assoziiert werden<sup>66</sup>. Es gibt jedoch auch gegenteilige Ergebnisse, so dass die tatsächliche Bedeutung einer erhöhten ERCC1-Expression weiterer Untersuchungen bedarf. Auch Reparaturenzyme des MMR-Systems haben klinische Relevanz. Ein Verlust des MMR-Systems kann bei platinresistenten Tumoren beobachtet werden. Eine Chemotherapie mit Cisplatin kann Tumorzellen mit inaktivem MMR-System selektieren und so zu klinischer Resistenz führen<sup>67</sup>. Defekte in den MMR-Genen MSH2 und MLH1 werden häufig bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen gefunden<sup>68</sup>; auch bei der Entstehung anderer Krebsarten wie Mamma-, Ovarial- oder Prostatakarzinom scheint ein Defekt im Gen für MLH1 eine wichtige Rolle zu spielen<sup>69</sup>. Die klinische

Bedeutung von p53 ist sehr umstritten, da es gegenteilige Ergebnisse zu der Rolle des p53-Status in Bezug auf resistente Tumoren gibt<sup>70</sup>.

Da der Erfolg einer platinhaltigen Chemotherapie durch bestehende oder erworbene Resistenz beeinträchtigt sein kann, ist es von großem Interesse, Mechanismen, die zu einer Platinresistenz führen, zu untersuchen und Einflussfaktoren auf die Sensitivität von Tumorzellen zu ermitteln. Dadurch könnten Strategien entwickelt werden, die es zulassen, prognostische Aussagen über das Ansprechen einer platinhaltigen Chemotherapie zu machen oder die es ermöglichen, die Resistenz zu überwinden.

#### **1.4 Tumorzelllinien zur Untersuchung von Resistenzmechanismen**

Häufig benutzt man zur Aufklärung von Resistenzmechanismen Zelllinienmodelle, von denen die resistenten Varianten aus der parentalen Linie durch eine allmähliche Konzentrationserhöhung eines gewählten Zytostatikums herangezogen wurden. Das Ausmaß der Resistenz (Resistenzgrad) kann man mit Hilfe verschiedenster Methoden bestimmen. Man unterscheidet dabei zwischen Klonogenitäts- und Proliferationsassays. Zu den am häufigsten benutzten Proliferationsassays gehören der Sulforhodamin B-Assay (SRB-Assay) und der MTT-Assay.

Zelllinienmodelle haben den Vorteil, dass man immer Tumorzellen zur Verfügung hat und nicht auf schlecht zugängliches Patientenmaterial angewiesen ist. Weiterhin können Kultivierung und Versuchsbedingungen standardisiert werden, und es sind auch Versuche durchführbar, die einer hohen Zellzahl bedürfen. Die Zelllinien sind nicht durch fremde Zellen verunreinigt und bilden eine mehr oder weniger homogene Population.

Der entscheidende Nachteil ist jedoch, dass Zelllinien nicht die *In-vivo*-Situation widerspiegeln. Ergebnisse aus Versuchen mit Zelllinien sind nur bedingt auf die Situation im Patienten übertragbar. Ein weiterer Nachteil ist, dass auch Zelllinien sich verändern und nach einigen Passagen wichtige Eigenschaften verloren oder neu erworben haben.

Trotzdem sind Zelllinienmodelle wichtige und unverzichtbare Hilfsmittel bei der Erforschung verschiedenster Fragestellungen und sind auch bei der Untersuchung von Resistenzmechanismen von Platinkomplexen unverzichtbar.

## 1.5 Zielsetzung

Die DNA-Platinierung spielt eine wichtige Rolle bei der Wirkung von Cisplatin. Eine zentrale Rolle bei der Cisplatinwirkung spielen die Platin-DNA-Addukte. Die Adduktbildung hat einen hohen prädiktiven Wert im Hinblick auf das Tumoransprechen gezeigt und gilt als zentraler Parameter bei der Charakterisierung der Platinsensitivität. Die Tumorzellen können dem Ausmaß der DNA-Platinierung und damit dem zytotoxischen Effekt durch verschiedene Mechanismen entgegensteuern.

Ziel dieser Arbeit war es, anhand von cisplatin sensitiven und -resistenten Tumorzelllinien verschiedene Parameter mit Einfluss auf die DNA-Platinierung zu untersuchen. Die Quantifizierung dieser Parameter sollte dazu beitragen, ihre Bedeutung für die Charakterisierung der Platinsensitivität zu beurteilen und die für die Cisplatinresistenz verantwortlichen Mechanismen zu untersuchen.

Dieses Ziel sollte durch folgendes Vorgehen erreicht werden:

- Charakterisierung der cisplatin sensitiven und -resistenten Tumorzelllinien
- Bestimmung des Resistenzgrades für das jeweilige Zelllinienpaar
- Quantifizierung der Platin-DNA-Adduktbildung und Vergleich mit Resistenzgrad
- Untersuchung der DNA-Reparaturgeschwindigkeit
- Quantifizierung der intrazellulären Glutathionkonzentration mittels CZE
- Untersuchung der intrazellulären Cisplatinkonzentration (Uptake und Efflux)
- Vergleich der untersuchten Parameter mit der DNA-Platinierung und dem Resistenzgrad

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Cisplatin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Salpetersäure 65 % (V/V)	Merck, Darmstadt
Purelab Plus <sup>®</sup> -Wasser	USF Reinstwassersysteme, Ransbach-Baumbach
Argon 4.6	Air Product, Hattingen
Protease, lyophilisiert	Qiagen, Hilden
Proteinase-K	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Ribonuclease A (69 Kunitz units/mg)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Ethanol 96 - 100 % (V/V)	Merck, Darmstadt
Tris (= 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol) eingesetzt als Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
AL-Puffer (Lyse-Puffer)	Qiagen, Hilden
AW 1-Puffer (Wasch-Puffer)-Konzentrat	Qiagen, Hilden
AW 2-Puffer (Wasch-Puffer)-Konzentrat	Qiagen, Hilden
AE-Puffer (Elutions-Puffer)	Qiagen, Hilden
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat 2 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
RPMI 1640-Medium <sup>®</sup>	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
D-MEM-Medium <sup>®</sup> mit GlutaMAX <sup>®</sup>	Invitrogen Gibco, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Konz. Penicillin: 10000 I.E./mL	
Konz. Streptomycin: 10 mg/mL	
L-Glutamin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Trypsin-EDTA-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Casy <sup>®</sup> ton, Isotone Salzlösung	Schärfe System, Reutlingen

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Isopropanol 100 %	Merck, Darmstadt
Salzsäure 37 % (m/V)	Merck, Darmstadt
Salzsäure-Lösung (HCl 0,1 M)	Grüssing, Filsum
Glutathion (GSH)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Perchlorsäure 70 % (m/V)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Acetonitril	Promochem GmbH, Wesel
EDTA, Dinatriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Borsäure	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
Natronlauge (NaOH 1 M)	Riedel de Haën AG, Seelze
Naphthalendialdehyd (NDA)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Promochem GmbH, Wesel

### 2.1.2 Hergestellte Puffer und Lösungen

#### PBS-Lösung (Phosphate buffered saline)

Natriumchlorid	8,0 g
Dinatriumhydrogenphosphat · 2 H <sub>2</sub> O	1,4 g
Kaliumdihydrogenphosphat	0,2 g
Kaliumchlorid	0,2 g
Purelab Plus <sup>®</sup> -Wasser	ad 1000,0 mL

#### 0,9 %-ige Natriumchlorid-Lösung

Natriumchlorid	9,0 g
Purelab Plus <sup>®</sup> -Wasser	ad 1000,0 ml

#### MTT-Lösung

MTT	50 mg
PBS-Lösung	ad 100,0 mL

#### Isopropanol / HCl

Isopropanol 100 %	50 ml
Salzsäure 37 % (m/V)	165 µL

#### AW 1-Puffer (Wasch-Puffer)

AW 1-Konzentrat*	95 mL
Ethanol 96% (V/V)	ad 220 mL

\* Die genaue Zusammensetzung wird von der Fa. Qiagen nicht mitgeteilt.

## AW 2-Puffer (Wasch-Puffer)

AW 2-Konzentrat*	66 mL
Ethanol 96% (V/V)	ad 226 mL

## AE-Puffer (Elutions-Puffer)

Tris-HCl	10 mmol/L
EDTA	0,5 mol/L
pH > 9	

## Protease-Lösung

Protease, lyophilisiert	≤ 7,5 AU/vial**
Purelab Plus®-Wasser	5,5 mL

## Proteinase-K-Lösung

Proteinase K, lyophilisiert	200 mg
Purelab Plus®-Wasser	ad 10 mL

## RNase-Lösung

Ribonuklease A	50 mg
Tris-HCl-Lösung (10 mM, pH 7,5)	ad 10 mL

## Cisplatin-Lösung zur Inkubation [4 mM]

Cisplatin	12,0 mg
Purelab Plus®-Wasser	ad 10,0 mL

## Cisplatin-Stammlösung (SL) [1 mg/mL Platin]

Cisplatin	15,4 mg
Purelab Plus®-Wasser	ad 10,0 mL

## Cisplatin-Arbeitslösung 1 (AL-1) [10 µg/mL Platin]

Cisplatin-Stammlösung	100 µL
Purelab Plus®-Wasser	ad 10,0 mL

## Cisplatin-Arbeitslösung 2 (AL-2) [1 µg/mL Platin]

Cisplatin-Arbeitslösung 1 (AL-1)	1000 µL
Purelab Plus®-Wasser	ad 10,0 mL

\* Die genaue Zusammensetzung wird von der Fa. Qiagen nicht mitgeteilt.

\*\* 1 mAU bedeutet eine Aktivität der Protease, durch die 1 µmol Thyrosin aus denaturiertem Hämoglobin in einer Minute bei 50 °C freigesetzt wird.

## Zellkulturmedien

RPMI 1640-Medium®	500 mL
FKS	50 mL
L-Glutamin	7,5 mL
Penicillin-Streptomycin-Lösung	5 mL
D-MEM-Medium® mit GlutaMAX®	500 mL
FKS	50 mL
Penicillin-Streptomycin-Lösung	5 mL
Boratpuffer 0,1 M, pH 9,2	
Borsäure	620 mg
Purelab Plus®-Wasser	ad 100,0 mL
Natronlauge 1 M	q. s. pH 9,2
Salzsäure / EDTA [2 mM EDTA]	
EDTA	744 mg
Salzsäure 0,1 M	ad 1000,0 mL
Perchlorsäure 3,3 % (m/V)	
Perchlorsäure 70 % (m/V)	4,7 g
Purelab Plus®-Wasser	ad 100,0 mL
Perchlorsäure / Acetonitril	
Perchlorsäure 3,3 % (m/V)	50,0 mL
Acetonitril	50,0 mL
NDA-Lösung [5 mM]	
NDA	9,2 mg
DMSO	ad 10,0 mL
Glutathion-Stammlösung (SL) [100 mM]	
Glutathion	30,7 mg
Salzsäure / EDTA	ad 10,0 mL
Glutathion-Arbeitslösung 1 (AL1) [0,1 mM]	
Glutathion SL	10 µL
Perchlorsäure / Acetonitril	ad 10,0 mL
Glutathion-Arbeitslösung 2 (AL2) [0,01 mM]	
Glutathion AL1	1000 µL
Perchlorsäure / Acetonitril	ad 10,0 mL

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Cellstar <sup>®</sup> -Röhrchen (15 mL)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Cellstar <sup>®</sup> -Röhrchen (50 mL)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
PP-Reaktionsgefäße (0,5, 1,5, 2 mL)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Graphitrohre, pyrolytisch beschichtet	Varian, Darmstadt
Platin-Hohlkathodenlampe (UltrAA <sup>®</sup> -Lampe)	Varian, Darmstadt
Probengefäße (2 mL, konisch)	Varian, Darmstadt
Cellstar <sup>®</sup> -Gewebekulturflaschen 175 cm <sup>2</sup>	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Cellstar <sup>®</sup> -Gewebekulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Cellstar <sup>®</sup> -Gewebekulturflaschen 25 cm <sup>2</sup>	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Gewebekulturschalen (Ø 100 mm)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Zellschaber	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Sterilfilter (0,2 µm, Celluloseacetat)	Merck, Darmstadt
Einmalspritze 10 mL	Braun, Melsungen
QIAamp <sup>®</sup> DNA Mini-Kit	Qiagen, Hilden
Tissue Culture Plate, 96 Wells	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Kapillare (fused silica, 75 µm ID, 365 µm OD)	Beckman Coulter, Fullerton, USA

### 2.1.4 Geräte

Purelab Plus <sup>®</sup> -Wasseraufbereitungsanlage	USF Reinstwassersysteme, Ransbach-Baumbach
Begasungsbrutschrank WTC Binder	WTC Labortechnik, Truttlingen
Laminar-Air-Flow-Werkbank	Heraeus, Hanau
VoluMate <sup>®</sup> Pipetten	Mettler-Toledo GmbH & Co, Gießen
Finnpipetten <sup>®</sup>	Labsystems, Helsinki, Finnland
Fisherbrand <sup>®</sup> -Einkanal-Pipetten	Fisher-Scientific, Schwerte
Inversmikroskop Axiovert <sup>®</sup> 25	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Beckman Microfuge <sup>®</sup> Lite Centrifuge	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Zentrifuge Allegra <sup>®</sup> 21 R	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Elektronische Präzisionswaage Kern 770	Gottl. Kern & Sohn, Albstadt
Wasserbad Büchi 461	Büchi, Schweiz



Ultraschallbad	Bandelin, Berlin
Probenmixer	Vortex, Würzburg
Atomabsorptionsspektrometer-System	Varian, Darmstadt
Spektrometer SpectrAA <sup>®</sup> Zeeman 220	
Graphitrohratomisator GTA 100	
Autosampler PSD 100	
Dell Computer: Software	
SpectrAA <sup>®</sup> 220, Version 2.20	
UV/VIS-Spektrophotometer	Amersham Pharmacia Biotech,
Ultrospec <sup>®</sup> 2100 pro	Uppsala, Schweden
Präzisionsküvetten Quarzglas Suprasil <sup>®</sup>	Hellme, Mülheim
Casy <sup>®</sup> 1 Zellzähler	Schärfe System, Reutlingen
Polarstar <sup>®</sup> -Galaxy	BMG-Lab-Technologies, Offenburg
pH-Meter inoLab pH level 2	WTW, Weilheim
Kapillarelektrophorese-System	Beckman Coulter, Fullerton, USA
P/ACE <sup>®</sup> 5510	
LIF-Detektor, Argon Ion Laser	
P/ACE Station Software (Version 1.21)	

### 2.1.5 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden humane Tumorzelllinien aus drei verschiedenen Geweben verwendet. Die Ovarialkarzinomzelllinie A2780, die Hodenkarzinomzelllinie 2102 und die Zervixkarzinomzelllinie HeLa. Durch schrittweises Erhöhen der Cisplatinkonzentration im Zellkulturmedium wurden zu den Zelllinien 2102, A2780 und HeLa cisplatinresistente Varianten selektioniert und als 2102 Klon A, B und E, A2780 cis und HeLa CK bezeichnet. Zur Aufrechterhaltung der Resistenz wurden die resistenten Zelllinien alle 3-5 Passagen mit geringen Cisplatinkonzentrationen (1-3  $\mu\text{M}$ ) inkubiert.

Die humane Hodenkarzinomzelllinie 2102 stammt von einem unvorbehandelten Patienten mit einem primären Keimzelltumor, der histologisch als Teratokarzinom mit Dottersacktumor-Anteilen eingestuft wurde. Die cisplatinresistenten Klone A, B und E wurden in der Abteilung Hämatologie und Onkologie der Universität Halle-Wittenberg etabliert und uns freundlicherweise von Herrn Dr. Voigt zur Verfügung gestellt. Zur

Etablierung der resistenten Klone wurde die parentale Zelllinie zehnmal einer zweistündigen Cisplatinexposition ausgesetzt (anfangs 30  $\mu\text{M}$ , später 20  $\mu\text{M}$ ).

Die humane Ovarialkarzinomzelllinie A2780 ist eine der am häufigsten untersuchten Zelllinien. Sie stammt von einer unvorbehandelten Patientin mit einem Karzinom der Eierstöcke. Die cisplatinresistente Zelllinie A2780 cis wurde durch chronische Exposition mit steigenden Cisplatinkonzentrationen resistent gezüchtet<sup>71</sup> und stammt aus der European Collection of Cell Cultures, Health Protection Agency, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, UK. Das Zelllinienpaar A2780 / A2780 cis wurde uns freundlicherweise von Herrn PD Dr. Kassack (Pharmazeutische Chemie, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt.

Die Zellen der Zelllinie HeLa, die aus einem Zervixkarzinom einer Patientin isoliert wurden, sind die ersten menschlichen Zellen, von denen eine permanente Zellkultur etabliert wurde. Die Bezeichnung der Zellen geht auf den Namen der Patientin, Henrietta Lacks, zurück. Die cisplatinresistente Zelllinie HeLa CK wurde uns freundlicherweise von Frau Prof. Osmak zur Verfügung gestellt, die diese Zelllinie in der Abteilung Molecular Genetics am Rudjer-Boskovic-Institut (Zagreb, Kroatien) etabliert hat<sup>72</sup>.

## **2.2 Zellkultur**

Sämtliche Arbeiten mit menschlichen Tumorzellen erfolgten unter einer Laminar-Air-Flow-Werkbank bzw. einer Zytostatika-Werkbank unter aseptischen Bedingungen, um eine Kontamination mit Bakterien oder Pilzen zu verhindern.

### **2.2.1 Auftauen der Zellen**

Zur Reaktivierung der eingefrorenen Zellen wurden die Kryovials mit der Zellsuspension im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Die verwendeten Nährmedien (s. Tab. 2.1) wurden ebenfalls bei 37 °C im Wasserbad aufgewärmt und in sterile Gewebekulturflaschen pipettiert. Die Zellsuspension wurde zu dem vorgewärmten Nährmedium pipettiert und zur Inkubation in den Brutschrank gegeben.

Tab. 2.1 Zur Aufzucht der verschiedenen Zelllinien verwendete Nährmedien

Zelllinie	Nährmedium
2102, 2102 Klon A, Klon B, Klon E	RPMI 1640-Medium <sup>®</sup>
A2780, A2780 cis	RPMI 1640-Medium <sup>®</sup>
HeLa, HeLa CK	D-MEM-Medium <sup>®</sup> mit GlutaMAX <sup>®</sup>

### 2.2.2 Zellvermehrung

Die Zellen wurden mit Nährmedium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. Der konstante CO<sub>2</sub>-Gehalt der Brutschrank-Atmosphäre gewährleistete zusammen mit dem im Medium enthaltenen Natriumhydrogencarbonat einen konstanten pH-Wert. Die Häufigkeit des Mediumwechsels richtete sich nach der ausgesäten Zellmenge sowie nach dem Verbrauch an Nährstoffen. Das Nährmedium wurde alle zwei bis drei Tage erneuert, indem altes Medium durch eine sterile Pasteurpipette abgesaugt wurde und neues, auf 37 °C vorgewärmtes Medium mit einer sterilen Messpipette hinzugegeben wurde. Der in dem Medium enthaltene Farbindikator Phenolrot zeigte durch Farbumschlag von rot nach gelb an, wenn das Nährmedium verbraucht war. Die Beobachtung der Zellen während der Aufzucht erfolgte visuell unter dem Inversmikroskop. Bei allen verwendeten Zelllinien handelte es sich um adhärenente Zelllinien, die einen Monolayer ausbildeten.

### 2.2.3 Splitten der Zellen

Zum Teilen der Zellen (*Splitten*) wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 mL PBS-Puffer gewaschen. Dadurch wurden trypsinhemmende Substanzen wie Kälberserum und Calcium entfernt. Anschließend wurde mit Trypsin-EDTA-Lösung versetzt. Trypsin löst die Zellen enzymatisch vom Untergrund und bringt sie in Suspension. Es wurde gewartet, bis die Zellen sich vom Boden der Zellkulturflasche lösten. Dann wurde mit frischem Medium einerseits Trypsin-EDTA inaktiviert und andererseits die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche abgespült und resuspendiert. Um restliches Trypsin-EDTA zu entfernen und eine Schädigung der Zellen durch Trypsin zu verhindern, wurde die Zellsuspension 4 min bei 260 g zentrifugiert und anschließend wieder in frischem Medium resuspendiert. Je nach Zelllinie und je nach

geplantem Versuch wurden die Zellen 1:5 bis 1:20 auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt und/oder die Zellsuspension komplett für einen Versuch verwendet.

#### 2.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 20 µL Zellsuspension zu 10 mL sterilfiltrierter Casy<sup>®</sup>ton-Lösung gegeben und im Casy<sup>®</sup>-Zellzählgerät vermessen. Das Casy<sup>®</sup>-Zellzählgerät basiert auf der Technik eines Coulter-Counters und bestimmt neben der Zellzahl auch den mittleren Durchmesser und das mittlere Volumen der untersuchten Zellen.

#### 2.2.5 Lagerung der Zellen

Backups der Zelllinien wurden mit 10 % DMSO in Kryovials tiefgefroren. Zum Einfrieren wurden die Zellen einer konfluenten Gewebekulturschale trypsinisiert, abgelöst und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in Nährmedium resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden je 0,9 mL in drei Kryovials pipettiert und jeweils mit 0,1 mL DMSO (= 10 %) versetzt. Die Kryovials wurden zunächst in einer Styroporbox auf -80 °C heruntergekühlt und nach einer Woche zur dauerhaften Lagerung in den Tank mit flüssigem Stickstoff (-196 °C) überführt.

### 2.3 Zytotoxizitätstest

#### 2.3.1 MTT-Assay

Bei dem MTT-Assay handelt es sich um einen Zytotoxizitätstest, mit dessen Hilfe man die zytotoxische Wirkung von Cisplatin auf Tumorzellen untersuchen kann. Er ist im Vergleich zur Hemmung der Koloniebildung einfacher in der Durchführung<sup>73</sup>. Der MTT-Assay wurde an unserem Institut durch *Mueller et al.* etabliert und optimiert<sup>74</sup>.

Mit Hilfe des MTT-Assays können noch lebende Zellen identifiziert werden, die in der Lage sind, das Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) durch mitochondriale Dehydrogenasen zu einem violetten Formazan-Produkt umzusetzen (Abb. 2.1). Mit steigenden Cisplatinkonzentrationen

nimmt die Anzahl der überlebenden Zellen und somit die Menge des gebildeten Farbstoffs ab (Abb. 2.2).

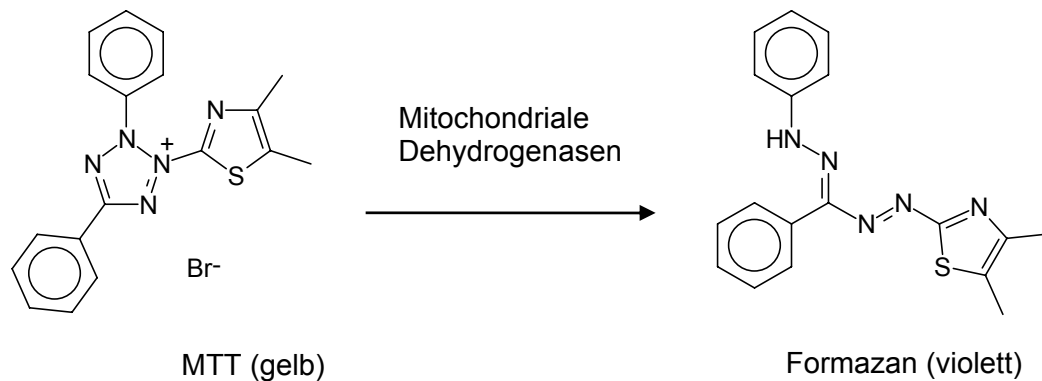


Abb. 2.1 Reaktionsgleichung des MTT-Assays

Für die Durchführung des MTT-Assays wurden die Zellen trypsinisiert, zentrifugiert, resuspendiert und die Zellzahl der Zellsuspension bestimmt. Die Zellsuspension wurde anschließend mit Nährmedium verdünnt, so dass eine Zellsuspension mit  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen/mL entstand. Von dieser Zellsuspension wurden je 90  $\mu$ L pro Well (ca. 10800 Zellen) in eine 96er Multiwell-Platte ausgesät. Über Nacht konnten sich die Zellen anheften und anschließend wurden die einzelnen Wells mit unterschiedlichen Cisplatinkonzentrationen versetzt und für 72 h inkubiert. Danach wurde jedes Well mit 20  $\mu$ L MTT-Lösung versetzt und für etwa 60 min inkubiert, bis erste Formazan-Kristalle in Form von Nadeln mikroskopisch sichtbar wurden. Um die entstandenen wasserunlöslichen Formazan-Kristalle in Lösung zu bringen und die Zellen zu lysieren, wurde eine Mischung aus Isopropanol und Salzsäure zugesetzt. Der durch den Zusatz von HCl verminderte pH-Wert der Lösung war nötig, um Einflüsse des im Nährmedium enthaltenen pH-Indikators Phenolrot auf die Absorption der Lösung zu minimieren. Die im Sauren vorliegende gelbe Farbe des Indikators störte die Absorptionsmessung des Formazans nicht.

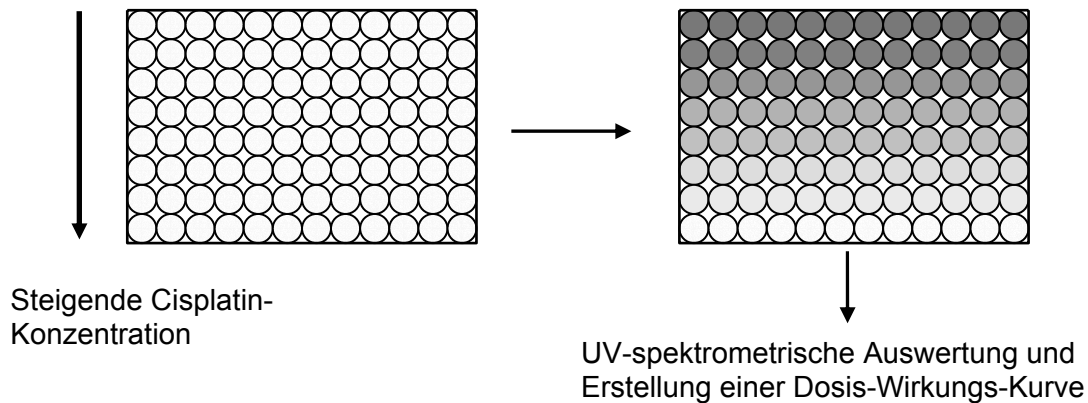


Abb. 2.2 Schematische Darstellung des MTT-Tests in 96-Well-Platten

Die Absorptionsmessung erfolgte UV-spektrometrisch in einem Multiwell-Reader (Polarstar<sup>®</sup>-Galaxy, BMG-Lab-Technologies, Offenburg) bei 595 und 690 nm. Die Absorptionen bei 690 nm wurden zur Korrektur von den Werten bei 595 nm abgezogen, damit das Ergebnis nicht durch die Absorption von nicht umgesetztem MTT bzw. von Zellbestandteilen und Proteinen verfälscht wurde. Die Ergebnisse wurden mit der Software GraphPad Prism<sup>®</sup> Version 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego) ausgewertet und aus den erhaltenen Dosis-Wirkungs-Kurven der EC<sub>50</sub>-Wert ermittelt. Die EC<sub>50</sub> ist in diesem Fall die Konzentration, bei der die Hälfte der Zellen abstirbt.

### 2.3.2 Bestimmung des Resistenzgrades

Aus den für jede Zelllinie ermittelten EC<sub>50</sub>-Werten für Cisplatin wurde dann nach folgender Gleichung der Resistenzgrad bestimmt:

$$\text{Resistenzgrad} = \frac{\text{EC}_{50} (\text{resistent})}{\text{EC}_{50} (\text{sensitiv})} \quad \text{Gl. 2.1}$$

Der Resistenzgrad gibt an, in welchem Verhältnis die EC<sub>50</sub> der resistenten Zelllinie und der sensitiven Zelllinie zueinander stehen.

## 2.4 Inkubationsversuche mit Cisplatin

### 2.4.1 DNA-Platinierung

Basis für die Wahl der Versuchsbedingungen für die Untersuchung der DNA-Platinierung stellte eine Literaturrecherche dar. Hierbei wurden die verwendete Zellzahl, die Cisplatinkonzentration und die Inkubationsdauer verglichen (s. Tab. 2.2).

Tab. 2.2 Versuchsbedingungen für DNA-Platinierung

Referenz	Zelllinienart	Zellzahl	Cisplatinkonz. [ $\mu\text{M}$ ]	Inkubationsdauer [h]	Analytik
Meijer et al. 1992 <sup>47</sup>	SCLC + Hoden-CA	$5 \cdot 10^7$	83 - 500	4	UV + AAS
Hospers et al. 1990 <sup>75</sup>	SCLC	$5 \cdot 10^7$	k.A.	4	UV + AAS
Kelland et al. 1992 <sup>76</sup>	Hoden-CA	$8 \cdot 10^7$	2,5 - 100	2	UV + AAS
Timmer-Bosscha et al. 1993 <sup>77</sup>	Hoden-CA	$5 \cdot 10^7$	16,7 - 67	4	UV + AAS
Mellish et al. 1993 <sup>78</sup>	Zervix-CA	$8 \cdot 10^7$	10 - 100	2	UV + AAS
Chao 1996 <sup>79</sup>	Lymphom	k.A.	0 - 150	5	ELISA
Yamada et al. 1999 <sup>80</sup>	Ovarial-CA	k.A.	300	1	UV + AAS
Yang et al. 2000 <sup>81</sup>	Hals / Nacken-CA	k.A.	50	1	UV + AAS
Hospers et al. 1990 <sup>82</sup>	SCLC	$5 \cdot 10^7$	100	1+2	UV + AAS
Parker et al. 1991 <sup>83</sup>	Ovarial-CA	k.A.	0-60	1	UV + AAS
Hill et al. 1994 <sup>84</sup>	Hoden-CA	k.A.	16,6	1	UV + LQ
Johnson et al. 1996 <sup>85</sup>	Leber-CA	k.A.	0-200	4	UV + AAS
Johnson et al. 1994 <sup>86</sup>	Ovarial-CA	k.A.	20-200	2	UV + AAS
De Pooter et al. 1996 <sup>87</sup>	Ovarial-CA	$2 \cdot 10^7$	120	1	ELISA
Li et al. 2000 <sup>53</sup>	Ovarial-CA	k.A.	IC <sub>50</sub>	1	UV + AAS

Ausgehend von den in der Literatur verwendeten Bedingungen und Ergebnissen von Vorversuchen wurden die Versuchsbedingungen wie folgt gewählt.

Nach Bestimmung der Zellzahl wurden zwischen  $5 \cdot 10^6$  und  $5 \cdot 10^7$  Zellen auf sterile Zellkulturschalen oder in Zellkulturflaschen ausgesät. Über Nacht konnten sich die Krebszellen an den Boden der Schalen anheften. Am nächsten Tag wurde das Nährmedium mit Cisplatinlösungen verschiedener Konzentration versetzt, so dass Endkonzentrationen von 10 - 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin im Nährmedium entstanden. Die Inkubation mit Cisplatin erfolgte bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  für 2 bzw. 4 Stunden. Die Inkubation wurde durch Absaugen des cisplatinhaltigen Mediums und zweimaliges Waschen mit je 5 mL eisgekühltem PBS-Puffer beendet. Danach wurden je Schale 2 mL Trypsin-EDTA-Lösung zugetropft und nach ca. 2 min Einwirkzeit die Zellen mit 8 mL frischem Nährmedium abgelöst und suspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 50 mL Cellstar<sup>®</sup>-Röhrchen überführt und für 4 min bei 260 g und 4 °C zentrifugiert. Das dadurch erhaltene Zellpellet wurde in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und zweimal mit 1 mL eingekühltem PBS-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Der überstehende PBS-Puffer wurde abgesaugt und das Zellpellet bis zur weiteren Bearbeitung bei -24 °C tiefgefroren.

### **2.4.2 DNA-Reparatur**

Zur Bestimmung der DNA-Reparatur wurde zunächst wie in Kap. 2.4.1 beschrieben verfahren. Die Cisplatinkonzentration betrug 100  $\mu\text{M}$ . Es wurden jedoch nicht alle Schalen nach Ende der Inkubationszeit mit Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst, sondern zweimal mit je 5 mL PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit 10 mL neuem, cisplatinfreiem Medium versetzt und für 2, 4 und 8 Stunden weiterinkubiert. Nach Ende der weiteren Inkubationszeit in cisplatinfreiem Medium wurde wie unter Kap. 2.4.1 beschrieben verfahren und die erhaltenen Zellpellets bis zur weiteren Bearbeitung bei -24 °C tiefgefroren.

### **2.4.3 Intrazelluläre Platinkonzentrationen**

Auch für die Quantifizierung der intrazellulären Platinkonzentration wurde eine Literaturrecherche durchgeführt (s. Tab. 2.3 und 2.4). Aufgrund der Versuchsbedingungen aus der Literatur und der Vorarbeiten im Arbeitskreis wurden nachfolgende Vorgehensweisen für die Bestimmung von Uptake und Efflux gewählt.



Tab. 2.3 Versuchsbedingungen zur Messung des Uptakes

Referenz	Zelllinien- art	Cisplati- konz. [ $\mu\text{M}$ ]	Inkubation- dauer [h]	Analytik	Platin bezogen auf
Andrews et al. 1988 <sup>88</sup>	Ovarial-CA	100	1	AAS	Protein
Hospers et al. 1990 <sup>75</sup>	SCLC	k. A.	4	AAS	Zellzahl
Parker et al. 1991 <sup>83</sup>	Ovarial-CA	EC <sub>50</sub>	1	AAS	Zellzahl
Kelland et al. 1992 <sup>76</sup>	Hoden-CA	2,5 - 100	2	AAS	Protein
Nicolson et al. 1992 <sup>89</sup>	Leukämie	10 - 80	2	AAS	Protein
Loh et al. 1992 <sup>90</sup>	Ovarial-CA	5 - 100	2	AAS	Protein
Timmer-Bosscha et al. 1993 <sup>77</sup>	Hoden-CA	10 - 67	2	AAS	Zellzahl
Mellish et al. 1993 <sup>78</sup>	Zervix-CA	1 - 100	1	AAS	Protein
Hill et al. 1994 <sup>91</sup>	Hoden-CA	0 - 16,6	1	AAS	Zellzahl
Johnson et al. 1994 <sup>86</sup>	Ovarial-CA	20 - 200	2	AAS	Zellzahl
Johnson et al. 1996 <sup>85</sup>	Leber-CA	0-200	4	AAS	Protein
Zhengdong et al. 1996 <sup>92</sup>	Ovarial-CA	75	2	AAS	Protein
Lindauer et al. 1996 <sup>93</sup>	Mama-CA	3	bis 30	AAS	Zellzahl
Koga et al. 2000 <sup>94</sup>	Blasen-CA	6,6 - 13,3	2	AAS	Protein

## Uptake

Nach Bestimmung der Zellzahl (siehe Kap. 2.2.4) wurden je  $5 \cdot 10^6$  Zellen in sterile Gewebekulturflaschen ( $25 \text{ cm}^2$ ) ausgesät. Diese Zellzahl war ausreichend, um die Boden der Flaschen ausreichend mit Zellen zu bedecken. Über Nacht konnten sich die Krebszellen an den Boden der Flaschen anheften. Am nächsten Tag wurde das überstehende Medium abgesaugt und durch 9,5 mL neues Medium ersetzt. Mit einer Pipette wurden dann 0,5 mL einer 2000  $\mu\text{M}$  Cisplatinlösung zugegeben, sodass eine Endkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin im Nährmedium entstand. Zu den Messzeitpunkten (0, 2, 5, 10, 60 und 120 min) wurde das cisplatinhaltige Medium

schnell abgesaugt, um eine weitere Aufnahme von Cisplatin zu verhindern. Im Anschluss daran wurden die Zellen zweimal mit je 5 mL eisgekühltem PBS-Puffer gewaschen, um evtl. Reste des Nährmediums und von Cisplatin zu entfernen. Danach wurden je Schale 2 mL Trypsin-Lösung zugetropft. Nach ca. 2 min Einwirkzeit wurde das Trypsin mit 8 mL cisplatinfreiem Nährmedium inaktiviert. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren der Suspension wurden die restlichen Zellen abgelöst und anschließend in ein 50 mL Cellstar<sup>®</sup>-Röhrchen überführt. Durch Zentrifugation für 4 min bei 260 g und 4 °C wurden die Zellen sedimentiert, sodass im Anschluss daran die überstehende Flüssigkeit abgesaugt werden konnte. Das so entstandene Zellpellet wurde in 1 mL PBS-Puffer durch zehnmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert, gewaschen und in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation in der Beckmannzentrifuge bei 6000 g für 1 min wurde abermals der Überstand abgesaugt und durch 1 mL frischen PBS-Puffer ersetzt. Das Pellet wurde resuspendiert und nach erneuter Zentrifugation bei 6000 g für 1 min wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet entweder eingefroren oder direkt weiter verarbeitet (s. Kap 2.5.2).

Tab. 2.4 Versuchsbedingungen zur Messung des Efflux

Referenz	Zelllinie-art	Cisplatin-konz. [µM]	Inkubations-dauer *	Analytik	Platin bezogen auf
Andrews et al. 1988 <sup>88</sup>	Ovarial-CA	100	1, bis 1	AAS	Protein
Parker et al. 1991 <sup>83</sup>	Ovarial-CA	EC <sub>50</sub>	1, 0,5 - 4	AAS	Zellzahl
Nicolson et al. 1992 <sup>89</sup>	Leukämie	40	2, 2	AAS	Protein
Loh et al. 1992 <sup>90</sup>	Ovarial-CA	50 + 200	0,5, 120	AAS	Protein
Johnson et al. 1996 <sup>85</sup>	Leber-CA	50 + 500	4, 0,5 / 4	AAS	Protein
Chau et al. 1999 <sup>95</sup>	Lungen-CA	509	0,33, 0,17 - 0,83	AAS	Protein

\* vor dem Komma: Uptake, nach dem Komma: Efflux

## Efflux

Wie beim Uptakeversuch wurden nach Bestimmung der Zellzahl ca.  $5 \cdot 10^6$  Zellen auf sterile Gewebekulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>) verteilt und über Nacht zum Anheften der Krebszellen auf dem Flaschenboden in 10 mL Nährmedium im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Nährmedium abgesaugt, durch 9,5 mL neues Medium

ersetzt und 0,5 mL der 2000  $\mu\text{M}$  Cisplatinlösung hinzugefügt. Im Anschluss daran wurden die Zellen 2 Stunden im Brutschrank inkubiert. Das Nährmedium wurde danach durch Absaugen entfernt und nach zweimaligem Waschen mit je 5 mL PBS-Puffer durch neues, zytostatikafreies Medium ersetzt. Nach 0, 2, 5, 10, 60 und teilweise auch 120 min wurde der Efflux durch schnelles Absaugen des Überstandes beendet und zweimal mit je 5 mL eisgekühltem PBS-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von 2 mL Trypsin wurde wie für den Uptakeversuch beschrieben fortgefahren.

## 2.5 Analytik von Platin mittels Atomabsorptionsspektrometrie

Die Quantifizierung von intrazellulärem und an DNA gebundenem Platin wurde mittels einer flammenlosen Atomabsorptionsspektrometrie-Methode mit Graphitrohrofentechnik (GF-AAS) durchgeführt. Die AAS-Technik ist aufgrund ihrer Spezifität, vergleichsweise geringer Kosten, kurzer Analysenzeiten und für die meisten bioanalytischen Fragestellungen ausreichend niedriger Bestimmungsgrenzen die Methode der Wahl zur Quantifizierung von Platinspezies.

Bei der Atomabsorptionsspektrometrie handelt es sich um ein spektralanalytisches Verfahren, mit dem sowohl der qualitative Nachweis als auch die quantitative Bestimmung von Metallatomen, wie z.B. Platin, durchgeführt werden kann. Eine Voraussetzung dafür ist, dass die Metallatome in den gasförmigen Zustand überführt werden, in dem sie in der Lage sind, bestimmte Energiebeträge in Form von Licht einer bestimmten Wellenlänge aufzunehmen und nach einer kurzen Anregungszeit wieder zu emittieren. Für die Erzeugung von Platinatomen im Grundzustand existieren zwei Möglichkeiten. Zum einen kann die Probe in einer Flamme, deren Temperatur und reduzierende Eigenschaften durch Verwendung unterschiedlicher Gase bzw. Gasgemische variiert werden können, zerstäubt und die enthaltenen Ionen in den atomaren Zustand überführt werden. Die zweite Möglichkeit, die auch im Rahmen dieser Arbeit angewandt wurde, besteht in der Graphitrohrofentechnik, die 1961 von L'vov entwickelt wurde (GF-AAS)<sup>96</sup>. Dabei wird die Probe in ein elektrisch beheizbares Graphitrohr injiziert und dieses durch Anlegen hoher Stromstärken nach einem bestimmten Temperaturprogramm aufgeheizt. Bei Temperaturen zwischen 2500 und 2700 °C kommt es zur Atomisierung der Platinionen und Überführung in den gasförmigen Zustand. Vorteilhaft gegenüber der Flammentechnik ist die deutlich niedrigere Bestimmungsgrenze. Diese wird dadurch erreicht, dass die Platinionen in der Probe nahezu quantitativ atomisiert wer-

den und die Atome für einen längeren Zeitraum im Strahlengang verweilen. Dies ist für die Analytik in biologischen Flüssigkeiten, die oft nur geringe Konzentrationen des Analyten enthalten, von besonderer Bedeutung. Die Platinatome sind in der Lage, eingestrahktes Licht zu absorbieren, welches dieselbe Wellenlänge aufweist, wie das Licht, das von den so angeregten Platinatomen bei ihrer Rückkehr in den Grundzustand wieder abgegeben wird. Daher wird zur Anregung die von einer Hohlkathodenlampe des zu analysierenden Elements erzeugte Emissionswellenlänge eingesetzt.

Der Zusammenhang zwischen der Absorption des Lichts durch die Platinatome der Probe und deren Konzentration wird durch das Lambert-Beer'sche Gesetz beschrieben, wonach die Abnahme der Lichtintensität durch Absorption der Konzentration der zu bestimmenden Substanz proportional ist.

$$A = \log \frac{I_0}{I} = k \cdot d \cdot c \quad \text{Gl. 2.2}$$

- A = Absorption
- $I_0$  = Lichtintensität des eingestrahkten Lichts
- I = Lichtintensität nach Durchgang durch die Probe
- k = Absorptionskoeffizient
- d = Schichtdicke
- c = Konzentration in der Probe

Das Gesetz gilt nur bei Messungen im linearen Bereich und bei einer definierten Schichtdicke; diese Voraussetzungen, v.a. eine definierte Schichtdicke, die bei der AAS-Technik der Länge der Atomwolke entspricht, sind kaum zu realisieren. Daher werden zur Quantifizierung die Kalibrierfunktionsmethode oder das Standardadditionsverfahren eingesetzt.

Die GF-AAS-Technik wird erfolgreich in der Bioanalytik von Platinkomplexen eingesetzt. Der Aufwand für die Probenaufarbeitung ist in der Regel sehr gering, da häufig nur ein einzelner Verdünnungsschritt durchgeführt wird oder die Probe sogar ohne weitere Vorbereitung direkt analysiert werden kann. Richtigkeit und Präzision werden von verschiedenen Autoren mit Werten für den relativen Fehler bzw. die relative Standardabweichung deutlich unter 15 % angegeben.

In dieser Arbeit wurde eine ursprünglich von *Kloft et al.*<sup>97</sup> entwickelte und von *Pieck*<sup>98</sup> modifizierte und mit dem auch in dieser Arbeit verwendeten Gerät validierte Methode angewandt. Daher war eine Validierung bzw. Teilvalidierung nicht erforderlich.

## 2.5.1 Messbedingungen

### Lichtquelle

Als Lichtquelle wurde eine UltrAA<sup>®</sup>-Lampe (s. Abb. 2.3) verwendet, die neben dem in allen Hohlkathodenlampen vorhandenen Elektrodenpaar aus Hohlkathode plus zugehöriger Anode ein weiteres Elektrodenpaar enthielt. Mit Hilfe dieser „Boost“-Elektroden wurde die Eigenabsorption der in der Hohlkathode entstehenden Platin-Atome vermindert. Dadurch resultierten eine höhere Intensität des emittierten Lichts und gleichzeitig ein geringeres Grundrauschen. Somit wurden Bestimmungen im unteren Konzentrationsbereich erleichtert. Die Messwellenlänge betrug 265,9 nm; die Lampe wurde mit einem Lampenstrom von 10 mA betrieben.

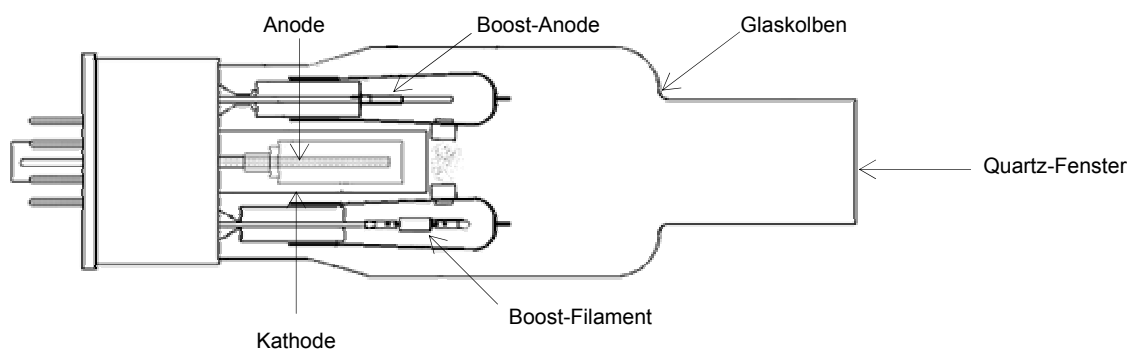


Abb. 2.3 Schematische Darstellung einer UltrAA<sup>®</sup>-Lampe

### Untergrundkorrektur

Zur Korrektur der Untergrundabsorption, die durch Streuung an Partikeln und Absorption durch organische Moleküle verursacht wird, wurde der *Zeeman*-Effekt ausgenutzt. *P. Zeeman* entdeckte das Phänomen, dass Emissionslinien von Atomen unter dem Einfluss eines Magnetfelds aufgespalten werden. Der Untergrund weist keine Zeeman-Aufspaltung auf.

Sämtliche Messungen wurden sowohl bei angeschaltetem (0,8 Tesla) als auch bei abgeschaltetem Magnetfeld durchgeführt; zwischen diesen beiden Zuständen lagen 4,8 ms. Bei abgeschaltetem Magnetfeld wurden die Absorptionen des Elements und die des Hintergrunds gemessen. Bei angeschaltetem Magnetfeld wurde nur die Absorption des Hintergrunds erfasst, da die Elementlinie durch das angelegte Magnetfeld verschoben wurde. Die Differenz aus diesen beiden Messungen ergab dann die Intensität des Elementsignals<sup>99</sup>.

### Temperaturprogramm

Das Temperaturprogramm durchlief fünf Phasen und kann aufgeteilt werden in Trocknung, Vorveraschung, Veraschung, Atomisierung und Reinigung.

Die Trocknung diente der Verdampfung des Lösungsmittels der Probe und sollte möglichst lange und mit langsamem Temperaturanstieg erfolgen, um Siedeverzüge zu vermeiden. In der Vorveraschungs- und Veraschungsphase wurden Matrixbestandteile, wie zum Beispiel Proteine, entfernt. Es schloss sich die Atomisierungsphase an, in der Platin in die Gasphase und damit in den atomaren Zustand überführt wurde. Während der Atomisierungsphase fand die Signalaufzeichnung statt. In der abschließenden Reinigungsphase wurden mögliche Probenreste entfernt, der Graphitrohrföfen gekühlt und die nächste Messung gestartet. Während der Messung wurde kontinuierlich Argon durch das Graphitrohr geleitet. Argon verhinderte als Inertgas die Selbstentzündung des Graphitrohrs; außerdem unterstützte der Argonstrom den Trocknungs- und Veraschungsprozess. Der Argonstrom wurde während der Atomisierungsphase unterbrochen, um Störungen während der Signalaufnahme zu vermeiden.

Tab. 2.5 gibt einen Überblick über das verwendete Temperaturprogramm.

Tab. 2.5 Temperaturprogramm der GF-AAS

Schritt	Phasen	Temperatur [°C]	Dauer* [s]	Argonstrom [L/min]	Signal- aufnahme
1	Trocknung	95	5,0	3	nein
2		110	60,0	3	nein
3		120	10,0	3	nein
4	Vorveraschung	650	15,0	3	nein
5		650	20,0	3	nein
6	Veraschung	1300	10,0	3	nein
7		1300	4,0	3	nein
8		1300	2,0	0	nein
9	Atomisierung	2700	0,7	0	ja
10		2700	2,0	0	ja
11	Reinigung	2700	2,0	3	nein

\* Unter "Dauer" wurden die Zeitspannen angegeben, nach deren Ablauf die zugehörige Temperatur erreicht war. Wiederholung einer Temperaturstufe (z.B. 650 °C) bedeutet, dass diese Temperatur für die angegebene Dauer gehalten wurde.

## Probenaufarbeitung

Die Probenaufarbeitung erfolgte analog zu der Methode von *Kloft et al.*<sup>97</sup> durch einen Verdünnungsschritt. Je nach Zellzahl und Inkubationskonzentration und daher erwarteter Konzentration wurden unterschiedliche Verdünnungen hergestellt, deren Endkonzentrationen innerhalb des Kalibrierbereichs lagen. Die Proben wurden in zwei Schritten aufgearbeitet. Zunächst wurden sie mit konzentrierter Salpetersäure versetzt und bei 60 °C für 20 min auf dem Wasserbad lysiert, bis eine klare Lösung erhalten wurde. Nach dem Abkühlen wurde das Lysat mit Purelab Plus<sup>®</sup>-Wasser verdünnt.

Proben, deren Konzentrationen oberhalb des Kalibrierbereichs lagen, wurden durch den Autosampler des Geräts mit Wasser verdünnt. Wenn nach Verdünnung im Verhältnis 1:10 die Probenkonzentration nicht innerhalb des Kalibrierbereichs lag, wurde die Probe erneut mit entsprechend höherem Verdünnungsfaktor aufgearbeitet und vermessen.

## Kalibrierung

Für die Bestimmung der Platinkonzentrationen in Tumorzellen wurde vor jeder Messung eine Kalibrierung durchgeführt.

### *Herstellung von Stamm- und Arbeitslösungen*

Zur Herstellung einer wässrigen Cisplatinstammlösung (SL) wurden 15,4 mg Cisplatin-Reinsubstanz auf der Analysenwaage eingewogen und auf 10,0 mL mit Purelab Plus<sup>®</sup>-Wasser aufgefüllt. Es resultierte somit eine Cisplatinkonzentration von 1,54 mg/mL, die unter Berücksichtigung der molaren Massen von Cisplatin (300,0 g/mol) und der relativen Atommasse von Platin ( $A_r(\text{Pt}) = 195,1$ ) einer Platinkonzentration von 1,0 mg/mL entsprach. Die Stammlösung wurde aliquotiert und bei -24 °C gelagert.

Ausgehend von der Stammlösung wurden Arbeitslösungen hergestellt, die eine Platin-konzentration von 10,0 und 1,0 µg/mL aufwiesen. Auch diese Lösungen wurden aliquotiert und bei -24 °C gelagert.

### *Herstellung der Kalibratorlösungen*

AL-1 und Purelab Plus<sup>®</sup>-Wasser wurden für die Herstellung des am höchsten konzentrierten Standards gemischt, sodass Lösungen mit einer Konzentration von 50 ng/mL Platin entstanden. Die übrigen fünf Kalibratoren wurden aus Wasser und dem höchsten Kalibrator durch den Autosampler des Geräts (s. Tab. 2.6) hergestellt. Das

Injektionsvolumen betrug sowohl für die Standards als auch für die Proben immer 20  $\mu\text{L}$ .

Tab. 2.6 Herstellung der Kalibratoren durch den Autosampler des AAS-Systems

Standard	Platin- konzentration [ng/mL]	Volumen (Standard mit der höchsten Konzentration) [ $\mu\text{L}$ ]	Volumen (Purelab Plus <sup>®</sup> -Wasser) [ $\mu\text{L}$ ]
1	5,0	2	18
2	10,0	4	16
3	20,0	8	12
4	30,0	12	8
5	40,0	16	4
6	50,0	20	0

### Konzentrationsberechnung

Die Kalibratorreihen wurden mittels GF-AAS analysiert. Dabei wurde das Absorptionssignal über die Peakhöhe ausgewertet. Aus den bei der Mehrfachbestimmung erhaltenen Mittelwerten wurde mittels linearer Regression eine Kalibriergerade erstellt, die dann zur Berechnung der Platinkonzentrationen der vermessenen Proben diente. Eine Wichtung der Kalibriergeraden fand nicht statt.

### Qualitätssicherung während der Messung

Die Qualität der durchgeführten Platinquantifizierung wurde mit Hilfe von Qualitätskontrollproben (Quality Controls, QC) gesichert. Insgesamt sollten 10 % aller Proben aber mindestens sechs Proben eines Analysenlaufs QC-Proben sein. Es wurden drei bzw. vier Proben unterschiedlicher Konzentrationen durch Mischen von Purelab Plus<sup>®</sup>-Wasser mit AL-1 hergestellt und in Aliquoten bei  $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Über den gesamten Messzeitraum der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde vor Beginn einer Messreihe ein Aliquot aufgetaut und mit den Proben vermessen. Dadurch wurden die Messungen hinsichtlich ihrer Richtigkeit und Präzision überprüft. Um eine korrekte Messung zu gewährleisten, erfolgte nach 50 Proben eine Rekalibrierung.



Ein Analysenlauf wurde akzeptiert und zur Auswertung herangezogen, wenn folgende Kriterien erfüllt waren:

- Die relativen Fehler sollten 15 % (20 % im Bereich der Bestimmungsgrenze) nicht überschreiten.
- 67% aller QC-Proben sollten diese Bedingung erfüllen; bei 33% waren auch größere Abweichungen erlaubt. Allerdings sollte dies nicht bei allen Replikaten einer Konzentration vorkommen.

Jeder Kalibrator und jede Probe wurde im PROMT (Precision optimized measurement time)-Modus vermessen, d.h. es wurden mindestens zwei Injektionen durchgeführt. Bei einer Abweichung der Messsignale um mehr als 5 % folgten eine dritte Bestimmung und nötigenfalls noch eine vierte Messung. Lag die Standardabweichung dann nicht unter 15 % bzw. im Bereich der Bestimmungsgrenze unter 20 %, wurde die entsprechende Probe im folgenden Analysenlauf erneut vermessen.

Die Validierung erfolgte von Frau A.C. Pieck auf der Grundlage internationaler Anforderungen an bioanalytische Verfahren<sup>100,101,102</sup> mit Hilfe der Software MVA<sup>®</sup>, Version 2.0 (Novia GmbH, Saarbrücken)<sup>98</sup>. Die analytischen Methoden wurden hinsichtlich Selektivität, Messbereich, Bestimmungsgrenze, Linearität, Wiederfindung, Richtigkeit und Präzision validiert.

### 2.5.2 Quantifizierung der intrazellulären Platinkonzentration

Die intrazelluläre Platinkonzentration wurde an den Zelllinien nach unterschiedlicher Inkubationszeit untersucht. Dazu wurde das Zellpellet mit 150 µL konzentrierter Salpetersäure über Nacht lysiert und am nächsten Tag 1:10 mit Purelab Plus<sup>®</sup>-Wasser verdünnt. Diese Aufarbeitungsweise bot sich an, da die so erhaltene Probenlösung direkt mittels GF-AAS auf ihren Platingehalt untersucht werden konnte. Die erhaltene Platinkonzentration wurde anschließend auf das aus der Anzahl der in dem Versuch verwendeten Zellen und dem mittleren Zellvolumen berechnete Gesamt-Zellvolumen bezogen und als Pt-Menge / Zellvolumen angegeben. Da für die Untersuchungen ein Casy<sup>®</sup>-Zellzählgerät zur Verfügung stand, war die Bestimmung des Zellvolumens ein exaktes und schnelles Verfahren.

### 2.5.3 Quantifizierung der DNA-Platinierung

Zur Quantifizierung der DNA-Platinierung wurden Untersuchungen an den verschiedenen Tumorzelllinien durchgeführt. Die Adduktbildung wurde durch die Bestimmung des Platin-Nukleotid-Verhältnisses charakterisiert.

Die Quantifizierung der Platin-DNA-Addukte gliederte sich in drei Schritte. Nach Isolierung der DNA aus den Tumorzellen erfolgte aus derselben Probe die Quantifizierung der DNA und des an die DNA gebundenen Platins (s. Abb. 2.4).

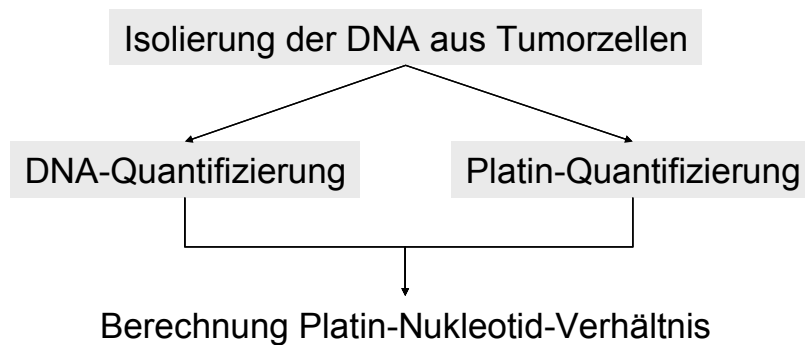


Abb. 2.4 Vorgehensweise bei der Bestimmung des Platin-Nukleotid-Verhältnisses

#### Isolierung der DNA

Die DNA-Isolierung erfolgte durch Festphasenextraktion mittels QIAmp<sup>®</sup> DNA-Blood-Mini-Kit (Qiagen, Hilden). Hinsichtlich der Volumina der zugesetzten Reagenzien und Puffer wurde das Probenaufarbeitungsprotokoll der Fa. Qiagen eingehalten.

Die Aufarbeitung ist schematisch in Abb. 2.5 dargestellt.

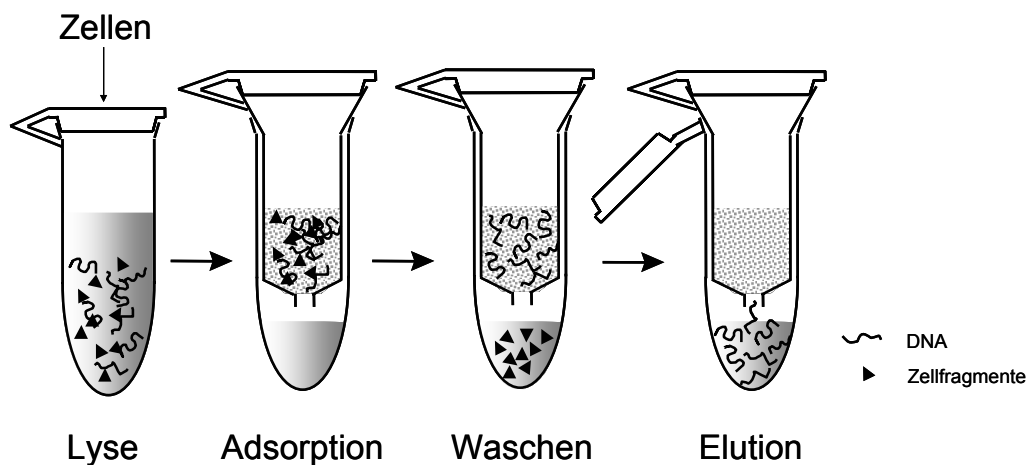


Abb. 2.5 DNA-Isolierung aus Tumorzellen durch Festphasenextraktion<sup>97</sup>

Im ersten Schritt wurde das Zellpellet mit 20 µL Protease und 200 µL Lysepuffer (Puffer AL) versetzt. Nach gründlichem Durchmischen wurde der Ansatz mit 20 µL RNase-Lösung versetzt und für 15 min im Ultraschallbad bei 56 °C inkubiert. Anschließend wurden 200 µL 96%-iger Ethanol (V/V) zugesetzt. Nachdem der Ansatz wiederum kräftig gemischt worden war, wurde das Lysat auf eine Silikasäule aufgegeben und eine Festphasenextraktion der DNA durchgeführt. Unter diesen Bedingungen (hohe Salzkonzentration, Ethanol, pH < 9) adsorbierte die DNA an die Silikamembran, so dass in zwei Waschsritten Zellbestandteile von der Säule gewaschen und die DNA aufgereinigt werden konnte. Dazu wurde jeweils 500 µL der Waschpuffer AW-1 und AW-2 auf die Säule gegeben und bei 6000 g für 3 min zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA in zwei Schritten mit jeweils 200 bzw. 100 µL des Elutionspuffers (Puffer AE; pH > 9) durch Zentrifugation bei 6000 g für 5 min von der Säule eluiert.

Das erhaltene Eluat wurde sofort weiter bearbeitet oder bis zur weiteren Bearbeitung bei -24 °C tiefgefroren.

### Quantifizierung des DNA-Gehalts

Die DNA-Konzentration und die Reinheit der isolierten DNA wurden mittels UV-Spektrometrie ermittelt. Dafür wurden die Proben mit Puffer AE auf eine Konzentration von ca. 10 bis 50 µg DNA/mL verdünnt und die Absorptionen bei den Wellenlängen 260, 280 und 320 nm ( $A_{260}$ ,  $A_{280}$ ,  $A_{320}$ ) gegen Puffer AE als Referenz gemessen.

Eine Voraussetzung für die Auswertbarkeit der Ergebnisse war eine Absorption bei 320 nm von  $< \pm 0,010$ . Dieser Wert diente als Nullwert und wurde von den Absorptionen bei 260 bzw. 280 nm abgezogen. Das Verhältnis dieser korrigierten Absorptionen ( $A_{260}^*$ ,  $A_{280}^*$ ) sollte zwischen 1,7 und 1,9 liegen. Auf diese Weise konnte eine vollständige Abtrennung der Proteine aus den Proben angenommen werden. Die Reinheitskriterien sind im Folgenden nochmals dargestellt.

$$A_{320} \leq 0,010 \text{ und}$$

$$\frac{A_{260}^*}{A_{280}^*} = 1,7 - 1,9$$

Gl. 2.3

Der DNA-Gehalt [ $\mu\text{g/mL}$ ] wurde aufgrund des linearen Zusammenhangs der korrigierten Absorption bei 260 nm und der DNA-Konzentration nach folgender Formel berechnet:

$$C_{\text{DNA}} [\mu\text{g/mL}] = 50 \cdot A_{260}^* \quad \text{Gl. 2.4}$$

Aus der erhaltenen Konzentration und dem Volumen des Eluats wurde die absolute Menge an DNA ermittelt; daraus wurde mit Hilfe der durchschnittlichen molaren Masse [ $M$  (Nukleotid) = 330 g/mol] die Stoffmenge an Nukleotiden berechnet.

Die DNA-Quantifizierung wurde von Frau A.C. Pieck hinsichtlich Richtigkeit und Präzision validiert<sup>98</sup>.

### Quantifizierung des Platingehalts mittels GF-AAS

Das Temperaturprogramm für die Adduktproben entsprach dem Programm, das für die Proben zur Bestimmung der intrazellulären Platinkonzentration verwendet wurde (s. Kap. 2.5.1). Das bei der DNA-Isolierung erhaltene Eluat wurde ohne weitere Vorbereitung zur Messung eingesetzt.

Die für die Messung der Proben notwendige Kalibrierung erfolgte wie in Kap. 2.5.1 beschrieben.

Für Proben, deren Konzentrationen unter 5,0 ng/mL lagen, wurde eine Kalibrierung im Bereich von 1,0 - 10,0 ng/mL durchgeführt. Um diesen Konzentrationsbereich sicher vermessen zu können, wurde die Dreifachinjektionstechnik angewandt. Dazu wurden jeweils dreimal 20  $\mu\text{L}$  der jeweiligen Lösung injiziert. Zwischen den Wiederholinjektionen fand eine Vorveraschung bis zum Schritt 5 des Temperaturprogramms (s. Tab 2.5) statt. Die Herstellung der Kalibratorlösungen in diesem Konzentrationsbereich durch den automatischen Probengeber des Gerätes ist in Tab. 2.7 dargestellt.

Die Konzentrationsberechnung erfolgte, wie in Kap. 2.5.1 beschrieben, mittels linearer Regression. Die Bestimmung von Platin in den Adduktproben mittels GF-AAS wurde hinsichtlich Selektivität, Bestimmungsgrenze, Linearität, Wiederfindung, Richtigkeit und Präzision von Frau A. C. Pieck validiert<sup>98</sup>.

Tab. 2.7 Herstellung der Kalibratoren durch den Autosampler der AAS für den Kalibrierbereich von 1,0 - 10,0 ng/mL

Kalibrator	Platinkonzentration [ng/mL]	Volumen (höchster Kalibrator) [ $\mu$ L]	Volumen (Wasser) [ $\mu$ L]
1	1,0	2	18
2	2,0	4	16
3	3,0	6	14
4	4,0	8	12
5	5,0	10	10
6	7,5	15	5
7	10,0	20	0

### Berechnung der Platin-Nukleotid-Verhältnisse

Aus den Ergebnissen der DNA- und Platinbestimmung konnte das Platin-Nukleotid-Verhältnis berechnet werden. Zunächst wurden die Konzentrationen mit Hilfe der Probenvolumina in absolute Mengen umgerechnet. Aus diesen wurden mittels der molaren Masse der Nukleotide (330 g/mol) bzw. relativen Atommasse von Platin [ $A_r(\text{Pt}) = 195,1$ ] die Stoffmengen an Nukleotiden und Platin in der Probe berechnet und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Das Platin-Nukleotid-Verhältnis gilt als Maß für die DNA-Platinierung.

### 2.5.4 Quantifizierung der DNA-Reparaturgeschwindigkeit

Zur Quantifizierung der DNA-Reparaturgeschwindigkeit wurden die Zellen wie unter Kap. 2.4.2 beschrieben mit Cisplatin-Lösung inkubiert und anschließend für 2, 4 und 8 Stunden mit neuem, cisplatinfreiem Medium inkubiert. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der DNA-Platinierung wie unter Kap. 2.5.3 beschrieben. Somit konnte eine Veränderung der DNA-Platinierung über die Zeit beobachtet und quantifiziert werden.

## 2.6 Quantifizierung der intrazellulären Glutathionkonzentrationen

Die Quantifizierung der intrazellulären Glutathionkonzentration in Tumorzellen erfolgte mittels Kapillarzonenelektrophorese mit LIF-Detektion (LIF = Laser-induzierte Fluoreszenz) nach einer Methode von *Parmentier et al.*<sup>103</sup>.

### 2.6.1 Trennsystem und Detektion

Die Auftrennung erfolgte in einer unbeschichteten *fused-silica* (amorphes Glas) Kapillare (Länge 37 cm, 75 µm ID, 365 µm OD) mit Boratpuffer (100 mM, pH 9,2) als Trennpuffer bei 25 °C und einer Spannung von 25 kV. Vor der Auftrennung der Probe wurde die Kapillare 10 min mit 1 M Natronlauge, 5 min mit Purelab Plus®-Wasser und 2 min mit Boratpuffer gespült. Die Injektion erfolgte durch hydrodynamischen Druck (0,5 psi = 34,5 mbar) für 5 s. Die Detektion erfolgte am Ende der Kapillare durch LIF mit einem luftgekühlten Argon-Ionenlaser bei 520 nm.

### 2.6.2 Probenvorbereitung und Derivatisierung

Für die Untersuchungen wurden  $10^6$  Tumorzellen auf Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm in 10 mL Kulturmedium ausgesät. Nach 18 Stunden wurden die angehefteten Zellen zweimal mit eisgekühltem PBS-Puffer gewaschen, mit 1,0 mL einer eisgekühlten Mischung aus Perchlorsäure und Acetonitril versetzt und mit einem Zellschaber abgekratzt. Die Zellfragmente wurden sofort für 10 min bei 5 °C und 12000 g abzentrifugiert und der Überstand bei -80 °C bis zur Messung gelagert.

Damit das nicht fluoreszierende Glutathion detektiert werden konnte, musste es vor der Auftrennung derivatisiert werden.

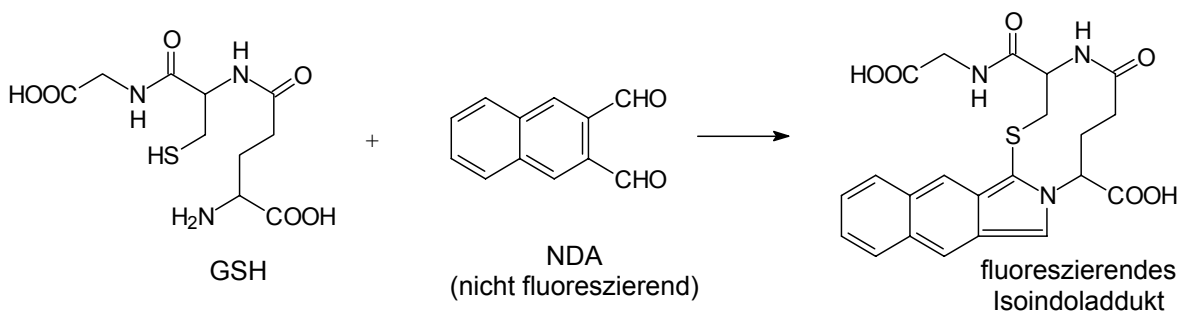


Abb. 2.6 Derivatisierungsreaktion von Glutathion (GSH) mit NDA

Die Derivatisierung der Probe erfolgte mit Naphthalendialdehyd (NDA), das mit Glutathion zu einem fluoreszierenden Isoindoladdukt reagiert (s. Abb. 2.6). Für die Derivatisierung wurden 100  $\mu\text{L}$  der Probe mit 25  $\mu\text{L}$  1 M Natronlauge, 100  $\mu\text{L}$  Boratpuffer und 25  $\mu\text{L}$  NDA-Lösung versetzt. Die resultierende Mischung wurde bei 20 °C für 7 min inkubiert, bevor sie in die CE injiziert wurde.

Zwischen den Messungen wurde die Kapillare für 2 min mit Purelab Plus<sup>®</sup>-Wasser und 2 min mit Boratpuffer gespült.

### 2.6.3 Validierung

Die Validierung erfolgte auf der Grundlage internationaler Anforderungen an bioanalytische Verfahren<sup>100,101,102</sup> mit Hilfe der Software MVA<sup>®</sup>, Version 2.0 (Novia GmbH, Saarbrücken). Die analytischen Methoden wurden hinsichtlich Selektivität, Messbereich, Bestimmungsgrenze, Linearität, Wiederfindung, Richtigkeit und Präzision validiert. Zudem wurden Stabilitätsuntersuchungen durchgeführt.

#### Selektivität

Die Selektivität ist die Fähigkeit einer analytischen Methode, den interessierenden Analyten ohne Verfälschung durch andere in der Probe vorhandene Komponenten zu erfassen und ihn somit eindeutig zu identifizieren.

Bestimmt wurde die Selektivität durch Vergleich der Elektropherogramme einer Leerprobe (Puffer) und einer Probe, die Glutathion enthielt.

#### Messbereich und Bestimmungsgrenze

Der Messbereich orientierte sich an der in den Zellen zu erwartenden Glutathionkonzentration und der Bestimmungsgrenze. Die Bestimmungsgrenze eines Analysenverfahrens ist die geringste Analytmenge in einer Messprobe, die mit hinreichender Präzision und Richtigkeit quantifiziert werden kann. Hinsichtlich der Präzision wurde eine relative Standardabweichung  $\leq 20\%$  gefordert, hinsichtlich der Richtigkeit ein relativer Fehler bis zu 20 % akzeptiert (vgl. Abschnitt *Richtigkeit und Präzision*).

## Linearität

Die Linearität ist die Fähigkeit einer Methode, innerhalb eines gewissen Bereichs Testergebnisse zu erzielen, die der Konzentration des Analyten direkt proportional sind. Die Beziehung zwischen Konzentration und Messsignal wurde mittels Kalibrierfunktion bestimmt. Für jede Kalibrierfunktion wurden jeweils sechs Standards (S) vermessen, die aus zwei verschiedenen Glutathion-Arbeitslösungen (AL) hergestellt wurden (s. Tab. 2.8)

Tab. 2.8 *Pipettierschema zur Herstellung der Glutathion-Standards der Kalibriergeraden*

Lösung	S1 (3 µM)	S2 (5 µM)	S3 (10 µM)	S4 (30 µM)	S5 (60 µM)	S6 (100 µM)
GSH-AL 1 (100 µM)	---	---	---	30 µL	60 µL	100 µL
GSH-AL 2 (10 µM)	30 µL	50 µL	100 µL	---	---	---
Perchlorsäure / Acetonitril	70 µL	50 µL	---	70 µL	40 µL	---

Die Derivatisierung der Standards erfolge wie in Kap. 2.6.2 beschrieben.

Zur Beurteilung der Regression wurden der Korrelationskoeffizient  $r$  und die Residuen, die prozentuale Abweichung der experimentellen von den mittels Regressionsgerade berechneten Werten, herangezogen. Ferner wurde getestet, ob eine gewichtete lineare Regression ( $1/x$  und  $1/x^2$ ) zu einer besseren Anpassung führt.

Eine Wichtung empfiehlt sich immer dann, wenn der Arbeitsbereich relativ groß ist ( $>$  Faktor 10). In diesem Fall ist in aller Regel Homoskedastizität (d.h. Varianzenhomogenität der Messwerte) nicht gegeben. Durch die Wichtung wird eine zu starke Beeinflussung der Regression, bedingt durch die relativ größeren Abweichungen der hohen Messwerte, vermieden.

## Wiederfindung

Die Ermittlung der Wiederfindung unter Verwendung von Zelllysate als Probenmatrix erfolgte durch Aufstockungsexperimente (sog. „spiken“). Einem Zelllysate wurden drei Lösungen unterschiedlicher Glutathionkonzentrationen zupipettiert. Danach wurden das reine Zelllysate als auch die drei gespikten Proben analysiert. Durch Subtraktion der



gemessenen Konzentration im reinen Zellysate von den gespikten Proben konnte die Wiederfindung bestimmt werden.

Die Wiederfindung wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$W [\%] = \frac{(C_S - C_U)}{C_A} \cdot 100 \quad \text{Gl. 2.5}$$

W = Wiederfindung

C<sub>S</sub> = Konzentration der aufgestockten Lösung

C<sub>U</sub> = Konzentration der unaufgestockten Lösung

C<sub>A</sub> = Konzentration des zugesetzten Analyten in der aufgestockten Lösung

### Richtigkeit und Präzision

Richtigkeit und Präzision bestimmen die Genauigkeit einer analytischen Methode. Die *Richtigkeit* drückt die Übereinstimmung zwischen der über die Kalibrierfunktion errechneten Konzentration und der nominalen Konzentration aus. Sie ist ein Lageparameter und gibt einen Hinweis auf systematische Fehler.

Als Maß für die Abweichung dient der prozentuale relative Fehler (Relative Error, RE), der wie folgt berechnet wird:

$$RE [\%] = \frac{(\bar{C}_{\text{gem}} - C_{\text{nom}})}{C_{\text{nom}}} \cdot 100 \quad \text{Gl. 2.6}$$

RE = Relativer Fehler

$\bar{C}_{\text{gem}}$  = Mittelwert der gemessenen Konzentration

C<sub>nom</sub> = Nominalkonzentration

Der relative Fehler des Mittelwerts sollte 15 % (bzw. 20 % im Bereich der Bestimmungsgrenze) nicht überschreiten.

Die experimentelle Bestimmung der Richtigkeit erfolgte über die Aufarbeitung und Quantifizierung der drei unterschiedlich konzentrierten QC-Proben an sechs verschiedenen Tagen.

Die *Präzision* ist ein Maß für die Übereinstimmung (Streuung) der Messergebnisse bei wiederholter Durchführung des Analysenverfahrens mit einer homogenen Probe und gibt somit Hinweise auf zufällige Fehler. Es wurden drei Proben innerhalb des

Konzentrationsbereiches analysiert. Für die Bestimmung der sog. *Within-day*-Präzision wurde die Aufarbeitung und Quantifizierung in einem Analysenlauf sechsmal wiederholt; für die *Between-day*-Präzision wurden die Proben an sechs unterschiedlichen Tagen aufgearbeitet und analysiert. Die statistische Größe der Präzision ist die relative Standardabweichung (relative standard deviation, RSD, vgl. Gl. 2.10).

Die relative Standardabweichung sollte 15 % nicht übersteigen; im Bereich der Bestimmungsgrenze wurden bis zu 20 % toleriert.

### Qualitäts-Kontroll-Proben (Quality Control Samples)

Zur Ermittlung der Präzision und Richtigkeit wurden Lösungen mit drei unterschiedlichen Glutathionkonzentrationen hergestellt (QC-Proben), die den gesamten Arbeitsbereich abdeckten:

QC-Probe 1: 5  $\mu\text{M}$  ( $\leq$  dreifache Konzentration des niedrigsten Standards)

QC-Probe 2: 50  $\mu\text{M}$  (mittlerer Konzentrationsbereich der Kalibriergerade)

QC-Probe 3: 90  $\mu\text{M}$  (= 75 - 90 % des höchsten Standards)

Die QC-Proben wurden ausgehend von der Glutathion-Stammlösung durch Verdünnung mit Perchlorsäure / Acetonitril hergestellt und nach Aliquotierung bei  $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### Stabilitätsuntersuchungen

Im Rahmen der Stabilitätsuntersuchungen wurden folgende Aspekte untersucht:

- Der Einfluss mehrerer Einfrier-Auftau-Vorgänge auf die Stabilität von GSH in der Stammlösung und der NDA-Lösung („Einfrier-Auftau-Stabilität“)
- Die Stabilität von GSH in der Arbeitslösung (gelagert bei Raumtemperatur)
- Die Stabilität der gebildeten Glutathion-Derivate in der Messprobe (gelagert bei Raumtemperatur im Autosampler des CE-Systems)

Zur Berechnung der Stabilität wurden jeweils die korrigierten Peakflächen (KPF) des derivatisierten Glutathions zugrunde gelegt:

$$\text{Stabilität [\%]} = \frac{\text{KPF}_x}{\text{KPF}_{\text{REF}}} \cdot 100 \quad \text{Gl. 2.7}$$

$\text{KPF}_x$  = korrigierte Peakfläche der Probe zur Zeit x

$\text{KPF}_{\text{REF}}$  = korrigierte Peakfläche der Referenz

Die Referenz stellte eine frisch hergestellte Probe, die Glutathion in der jeweils gleichen Konzentration enthielt, dar.

## 2.7 Statistik

### 2.7.1 Deskriptive Statistik

Zur zusammenfassenden Darstellung der Daten wurden folgende Lokalisations- und Dispersionsmaße herangezogen:

Arithmetischer Mittelwert ( $\bar{x}$ ): 
$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad \text{Gl. 2.8}$$

Standardabweichung (SD): 
$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \text{Gl. 2.9}$$

Relative Standardabweichung (RSD): 
$$RSD [\%] = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \text{Gl. 2.10}$$

$x_i$ : Messwerte

$n$ : Anzahl der Messungen

### 2.7.2 Beurteilende Statistik

Mit Hilfe der Teststatistik wird beurteilt, welche von zwei gegensätzlichen Hypothesen (Nullhypothese oder Alternativhypothese) über die Grundgesamtheit von Messwerten angenommen werden kann. Je nach Fragestellung und Beschaffenheit der Messwerte wurde ein entsprechender statistischer Test ausgewählt und die jeweilige Irrtumswahrscheinlichkeit ( $p$ ) berechnet, mit der die Nullhypothese fälschlicherweise abgelehnt wird. Das Ergebnis wurde als signifikant betrachtet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5 % lag ( $p < 0,05$ ). Bei Irrtumswahrscheinlichkeiten von  $p < 0,01$  lag ein hoch

signifikantes, bei  $p < 0,001$  ein höchst signifikantes Ergebnis vor. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Tests werden im Folgenden kurz erläutert.

### Prüfung auf Normalverteilung und Varianzhomogenität

Zunächst wurden die zu untersuchenden Variablen auf Normalverteilung geprüft. Da der Stichprobenumfang immer unter 50 Werte lag, wurde der *Shapiro-Wilk*-Test angewandt. Ein weiteres wichtiges Merkmal einer Verteilung im Hinblick auf die Auswahl eines statistischen Tests für den Gruppenvergleich ist die Varianzhomogenität; diese wurde mit Hilfe des *Levene*-Tests überprüft.

### Gruppenvergleich

Zur Beurteilung, ob sich Gruppen hinsichtlich bestimmter Merkmale signifikant unterschieden, wurden verschiedene statistische Tests herangezogen. Der jeweilige Test wurde in Abhängigkeit von der Skalierung und Verteilung der zu untersuchenden Parameter ausgewählt. Dabei wurde weiterhin unterschieden, ob es sich um abhängige oder unabhängige Variablen handelte, und wie viele Gruppen miteinander verglichen werden sollten.

Die für intervallskalierte und normalverteilte Variablen durchgeführten parametrischen Tests sind in Tab. 2.9 aufgeführt.

Tab. 2.9 Testverfahren für intervallskalierte und normalverteilte Variablen

Anzahl der Stichproben	Abhängigkeit	Test
2	unabhängig	t-Test nach Student
2	abhängig	t-Test für abhängige Stichproben
> 2	unabhängig	einfache Varianzanalyse
> 2	abhängig	einfache Varianzanalyse mit Messwiederholungen

Bei ordinalskalierten Werten bzw. nicht-normalverteilten intervallskalierten Variablen wurden die in Tab. 2.10 genannten nicht-parametrischen Tests durchgeführt. Bei diesen wurden nicht die Messwerte selbst, sondern deren Rangplätze für die Berechnung herangezogen.

Tab. 2.10 Testverfahren für ordinalskalierte oder nicht-normalverteilte intervallskalierte Variablen

Anzahl der Stichproben	Abhängigkeit	Test
2	unabhängig	U-Test nach Mann und Whitney
2	abhängig	Wilcoxon-Test
> 2	unabhängig	H-Test nach Kruskal und Wallis
> 2	abhängig	Friedman-Test

### Korrelationsanalyse

Bei einer Korrelationsanalyse wird die Existenz, Stärke und Richtung eines Zusammenhangs zwischen zwei Variablen untersucht. Die Berechnung gründet sich auf Wertepaare, die aus den zugrunde liegenden abhängigen Stichproben gebildet werden. Die Stärke des Zusammenhangs wird mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten  $r$  charakterisiert, der Werte zwischen  $-1$  und  $+1$  annehmen kann. Liegt ein starker Zusammenhang vor, so ist  $r = 1$ ; existiert gar kein Zusammenhang zwischen den beiden Variablen, so ist  $r = 0$ . Negative Korrelationskoeffizienten deuten auf einen gegenläufigen Zusammenhang hin. Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten hängt vom Skalenniveau und der Verteilung der zu untersuchenden Variablen ab. Bei intervallskalierten und normalverteilten Variablen wurde die Korrelation nach *Pearson*, bei mindestens einer ordinalskalierten oder nicht-normalverteilten Variable wurde die Rangkorrelation nach *Kendall* berechnet.

### Regressionsanalyse

Die Regressionsanalyse quantifiziert den Zusammenhang zwischen einer unabhängigen und einer abhängigen Variablen. Sie dient dazu, Zusammenhänge zu erkennen, die Art des Zusammenhangs zu erklären und den Wert der abhängigen aus den Werten der unabhängigen Variablen vorherzusagen. Mit Hilfe einer einfachen linearen Regressionsanalyse wird eine Gleichung ermittelt, die den linearen Zusammenhang der unabhängigen Variablen  $x$  und der abhängigen Variablen  $y$  beschreibt.

$$y = a \cdot x + b$$

Gl. 2.11

a: Steigung der Regressionsgleichung

b: Ordinatenabschnitt der Regressionsgleichung

### 3 Ergebnisse

Teile der Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Herrn S. Leyers im Rahmen einer Diplomarbeit an der Universität Bonn angefertigt<sup>104</sup>.

#### 3.1 Charakterisierung der Zelllinien

##### 3.1.1 Bestimmung der Zellzahl und des Zellvolumens

Die Bestimmung der Zellzahl und des Zellvolumens erfolgte wie unter Kap. 2.2.4 beschrieben mit Hilfe des Casy<sup>®</sup>-Zellzählgerätes.

Schon visuell waren unter dem Mikroskop Unterschiede in Zellgröße und Zellvolumen innerhalb eines Zelllinienpaares sichtbar. Daher wurden Proben vom Zelllinienpaar 2102 / 2102 Klon B, A2780 / A2780 cis und HeLa / HeLa CK über einen Zeitraum von mehreren Monaten hinsichtlich Zellgröße und Zellvolumen vermessen und ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.1 und Abb.3.2 dargestellt.

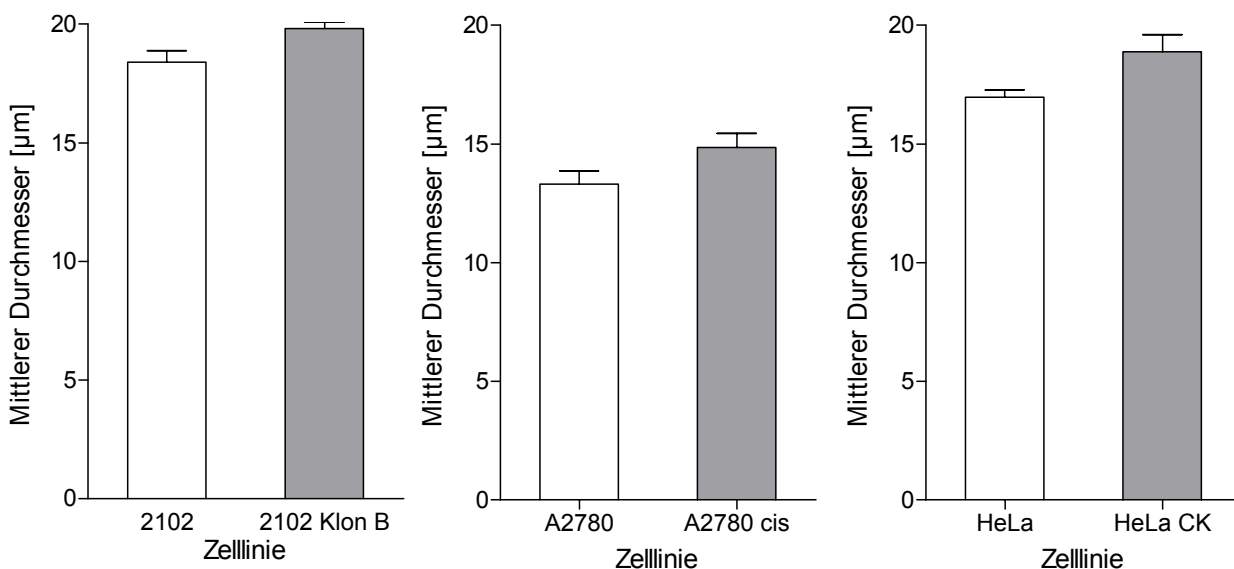


Abb. 3.1 Vergleich der Zellgröße von cisplatin sensitiven und -resistenten Zelllinien (MW  $\pm$  SD, n = 6-8)

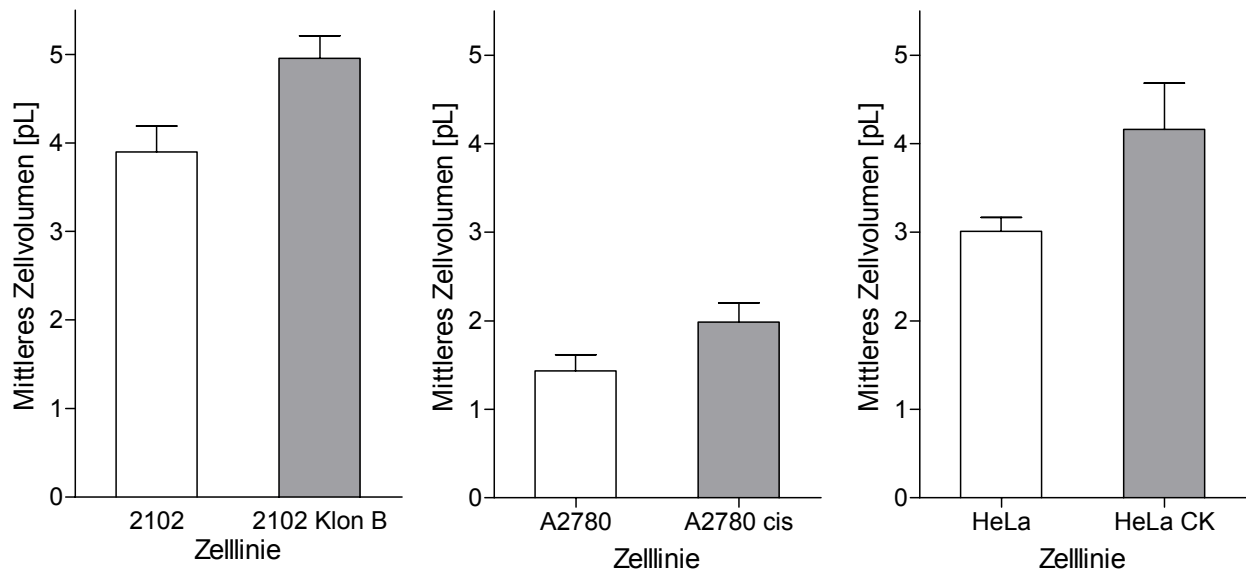


Abb. 3.2 Vergleich des Zellvolumens von cisplatinempfindlichen und -resistenten Zelllinien (MW  $\pm$  SD, n = 6-8)

Man erkennt, dass es Unterschiede in der Zellgröße innerhalb eines Zelllinienpaares gab, die sich noch deutlicher beim mittleren Zellvolumen äußerten. Sowohl für die Zellgröße als auch für das Zellvolumen waren die Unterschiede bei allen Zelllinienpaaren statistisch signifikant ( $p < 0,001$ ). Die Einzelwerte der Bestimmung der Zellzahl und des Zellvolumens sind in Anhang A dargestellt.

Aufgrund dieser Befunde wurden die Ergebnisse der Messung der intrazellulären Platin- und Glutathionkonzentrationen auf das Zellvolumen bezogen. Dazu wurde aus der eingesetzten Zellzahl und dem mittleren Zellvolumen das Gesamtzellvolumen der Probe berechnet.

### 3.1.2 Bestimmung der $EC_{50}$ und des Resistenzgrades

Die Bestimmung der  $EC_{50}$  und der damit ermittelte Resistenzgrad der cisplatinresistenten Zelllinien ist ein wichtiger Parameter zur Charakterisierung der Cisplatinempfindlichkeit. Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe des MTT-Assays. Die dort erhaltenen Werte wurden mit der Software GraphPad Prism<sup>®</sup> Version 4.0 ausgewertet. Man erhält Konzentrations-Effekt-Kurven, aus denen sich die  $EC_{50}$  bestimmen lässt.

Die  $EC_{50}$ -Werte wurden nach 72 h bestimmt, da die Wirkung von Cisplatin erst nach einiger Zeit einsetzt. In einem Vorversuch wurde versucht, die Inkubationsdauer auf

48 h zu verkürzen. Dies führte jedoch zu Konzentration-Effekt-Kurven, bei denen die  $EC_{50}$  nicht bestimmbar war, da bei den höheren Cisplatinkonzentrationen noch nicht eine ausreichende Zellzahl abgestorben war und die Kurve keinen Wendepunkt aufwies. Eine Übersicht der erhaltenen mittleren Absorptionen ist in Anhang A dargestellt.

### Hodenkarzinomzelllinien 2102, 2102 Klon A, Klon B und Klon E

Die Ergebnisse für die Zelllinie 2102 und ihre cisplatinresistenten Varianten sind in Abb. 3.3 und 3.4 dargestellt.

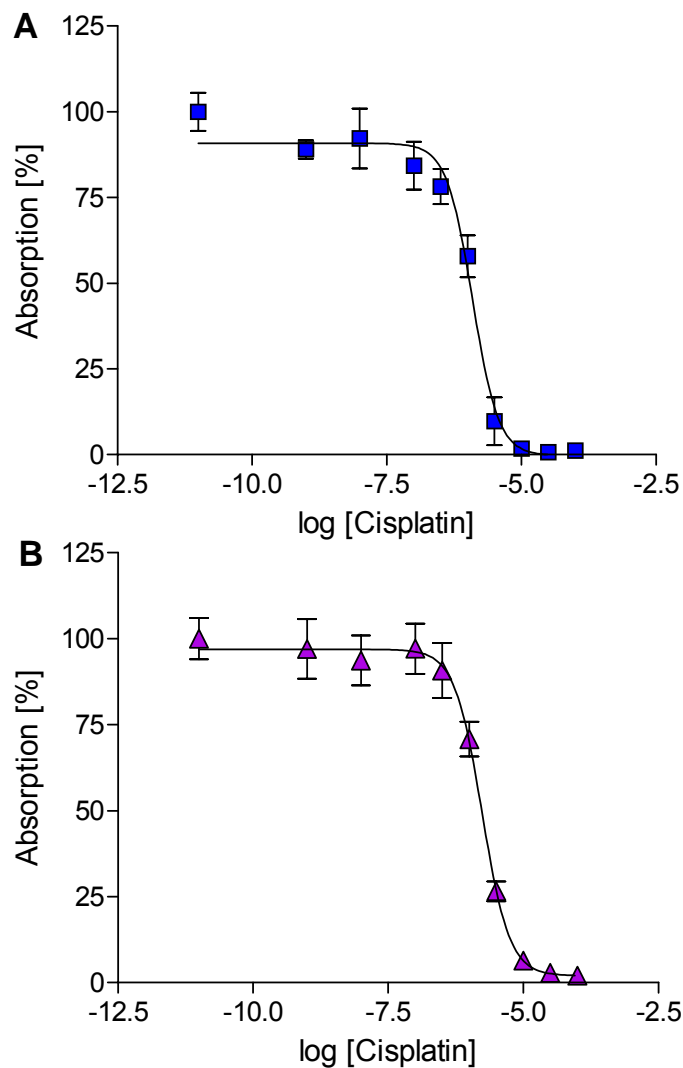


Abb. 3.3 Ergebnisse des MTT-Assays für die verwendeten Hodenkarzinomzelllinien 2102 (A), 2102 Klon A (B) (MW  $\pm$  SD, n = 18)



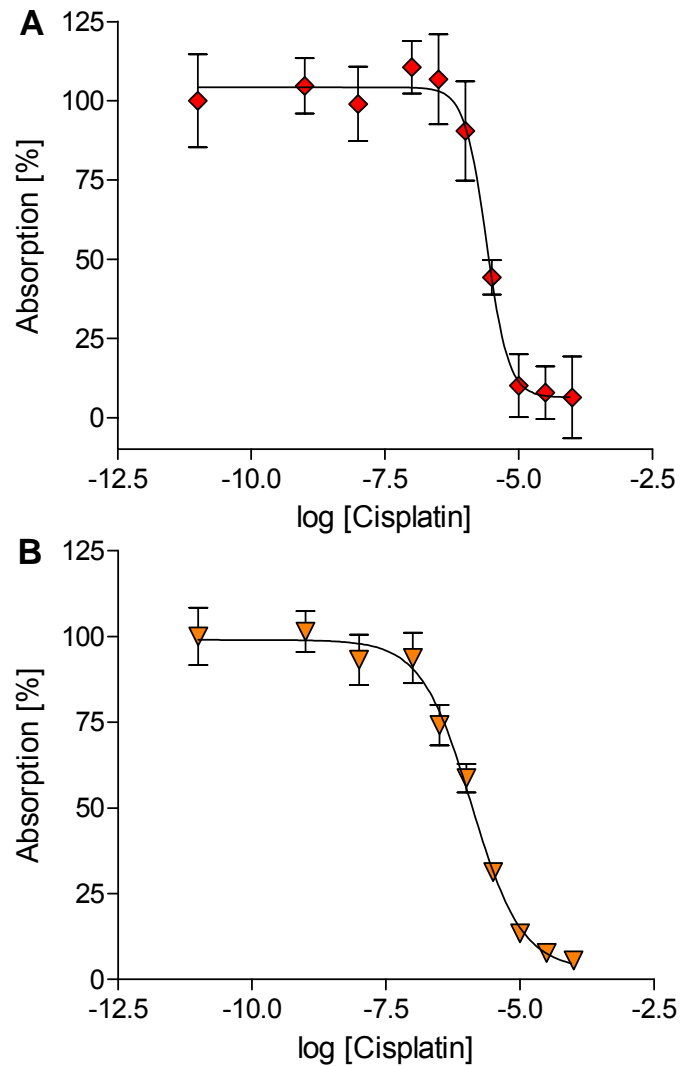


Abb. 3.4 Ergebnisse des MTT-Assays für die verwendeten Hodenkarzinomzelllinien 2102 Klon B (A) und 2102 Klon E (B) (MW  $\pm$  SD, n = 18)

Aus den erhaltenen  $EC_{50}$ -Werten konnte nun, wie unter Kap. 2.3.2 beschrieben, der Resistenzgrad für die cisplatinresistenten Varianten ermittelt werden (Tab. 3.1).

Tab. 3.1 Resistenzgrade für cisplatinresistente Varianten von 2102

Zelllinie	Resistenzgrad
2102 Klon A	1,37
2102 Klon B	1,94
2102 Klon E	0,99

2102 Klon A besaß nur einen geringen Resistenzgrad und Klon E praktisch keine Resistenz. Da sich bei 2102 Klon B mit 1,94 der höchste Resistenzgrad zeigte, wurde diese Zelllinie für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

### Ovarialkarzinomzelllinien A2780 und A2780 cis

Zu Beginn der Untersuchungen wurde der Resistenzgrad dieses Zelllinienpaares durch Frau S. Weykam aus dem Arbeitskreis PD Dr. Kassack bestimmt. Der Resistenzgrad betrug 5,4. Mit diesen Zellen wurden die Untersuchungen zur DNA-Platinierung durchgeführt.

Da Tumorzellen durch Lagerung und Aufzucht ihre Eigenschaften verändern, wurde im Laufe der Arbeit erneut der Resistenzgrad bestimmt. Die mittels MTT-Assay bestimmten Konzentrations-Effekt-Kurven des Ovarialkarzinomzelllinienpaares A2780 / A2780 cis, mit dem die Untersuchungen zur DNA-Reparatur sowie zu Uptake und Efflux durchgeführt wurden, sind in Abb. 3.5 dargestellt.

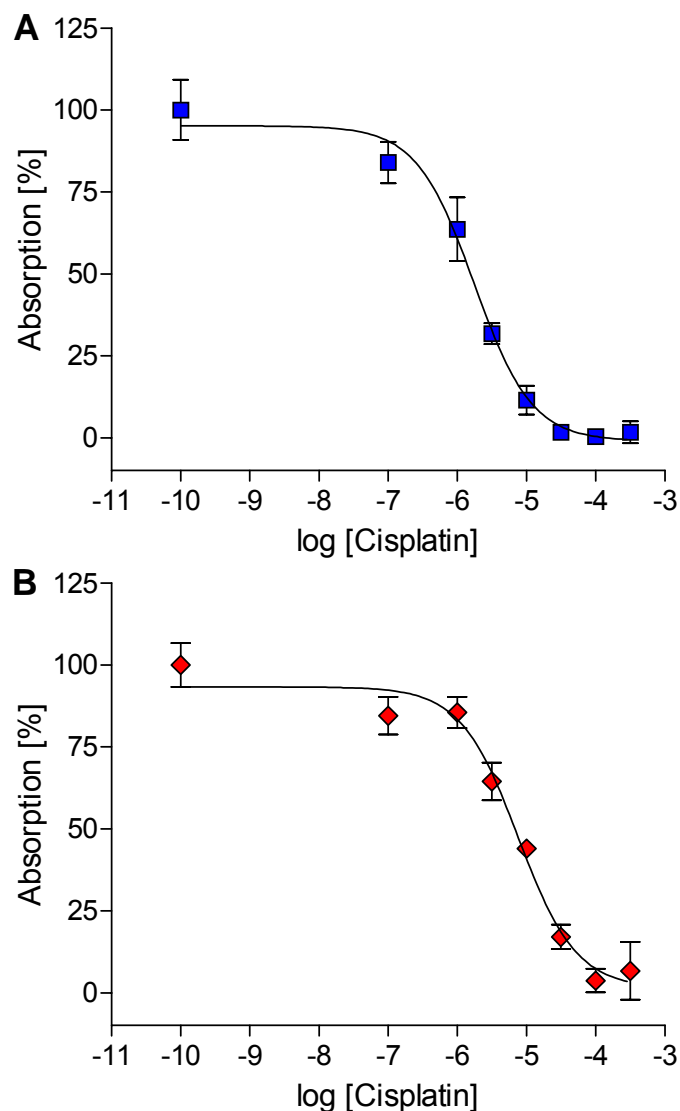


Abb. 3.5 Ergebnisse des MTT-Assays für die verwendeten Ovarialkarzinomzelllinien A2780 (A) und A2780 cis (B) (MW  $\pm$  SD, n = 12)

Daraus ergab sich ein Resistenzgrad von 4,3.

Zwischenzeitlich wurde auch der Resistenzgrad eines Zelllinienpaares untersucht, das über etliche Passagen ohne Cisplatin druck inkubiert wurde. Der Resistenzgrad war hier wesentlich geringer als in den frühen Passagen und lag nur noch bei 2,0. Dieses Ergebnis zeigte, dass eine Zelllinie bei längerer Aufzucht ohne Cisplatin druck seine erworbene Resistenz wieder verlieren kann. Daher wurden für weitere Untersuchungen nur noch Backups aus frühen Passagen verwendet. Bei Kultivierung über mehr als 4 Passagen hinweg, wurden die Zellen für 24 h mit 3  $\mu\text{M}$  Cisplatin inkubiert, um den Resistenzgrad aufrecht zu erhalten.

### Zervixkarzinomzellen HeLa und HeLa CK

Die durch den MTT-Assay bestimmten Konzentrations-Effekt-Kurven des Zervixkarzinomzelllinienpaares sind in Abb. 3.6 dargestellt.

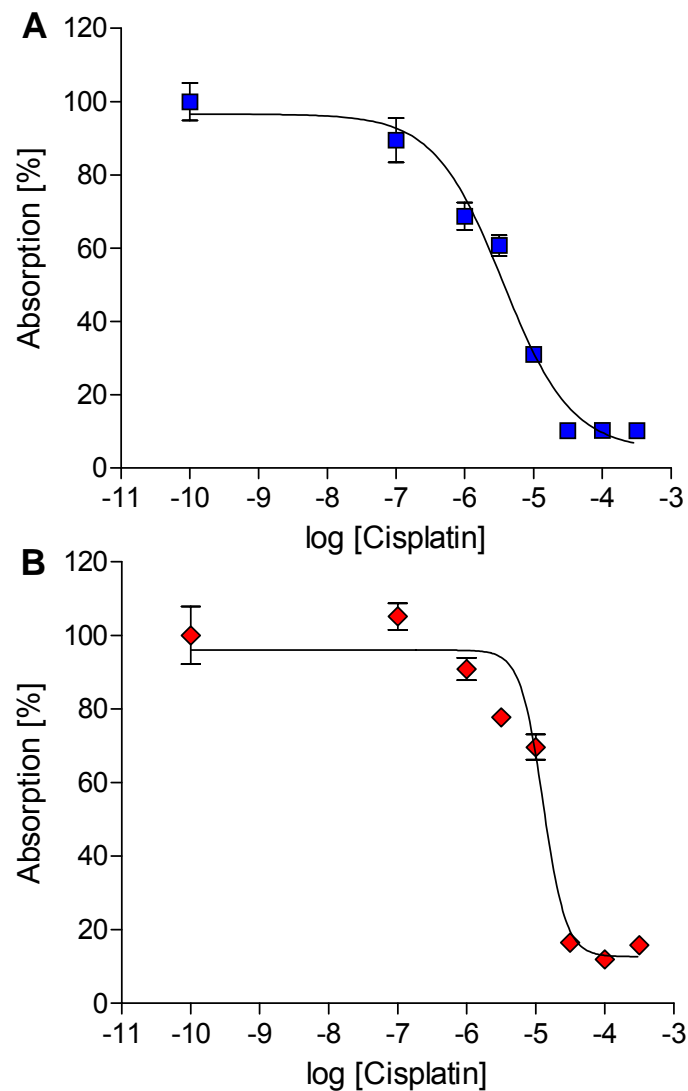


Abb. 3.6 Ergebnisse des MTT-Assays für die verwendeten Zervixkarzinomzelllinien HeLa (A) und HeLa CK (B) (MW  $\pm$  SD, n = 12)

Daraus ergab sich ein Resistenzgrad von 3,6.

Von der Zelllinie HeLa CK wurden frühzeitig genügend Zellen Backups angefertigt und eingefroren, auf die im weiteren Verlauf der Versuche zurückgegriffen werden konnte.

Die Untersuchungen zur DNA-Platinierung wurden mit allen drei Zelllinienpaaren durchgeführt. Da der Resistenzgrad der Zelllinie 2102 Klon B relativ gering war, wurden die Untersuchungen zur DNA-Reparatur, Uptake und Efflux und zur intrazellulären Glutathionkonzentration nur in den Zelllinienpaaren A2780 / A2780 cis und HeLa / HeLa CK durchgeführt.

### **3.2 Quantifizierung der DNA-Platinierung**

Die Quantifizierung der DNA-Platinierung in Tumorzellen erfolgte in mehreren Schritten. Nach Inkubation wurde aus den gewonnenen Zellen die DNA extrahiert. Diese wurde anschließend mittels UV-Spektrometrie quantifiziert. Die Bestimmung des an die DNA gebundenen Platins erfolgte mittels GF-AAS. Aus den so bestimmten DNA- und Platinkonzentrationen wurde dann das Platin-Nukleotid-Verhältnis berechnet als ein Maß für die Platin-DNA-Adduktbildung.

Da bei der angewendeten Methode zur Bestimmung des Platingehaltes weder die Methode noch der Standort geändert wurde, war es nicht notwendig, eine Teilvalidierung durchzuführen. Jedoch wurden während der Messung anhand von Qualitätskontrollproben Präzision und Richtigkeit bestimmt. Zu diesem Zweck wurden je nach Bestimmungsmethode QC-Proben mit den Konzentrationen 1, 2, 5 und 10 ng/ml (Dreifachinjektion) bzw. 10, 20 und 40 ng/ml (Einfachinjektion) verwendet.

Einen Überblick über die Ergebnisse gibt Tab. 3.2.

Tab. 3.2 Richtigkeit (RE [%]) und Präzision (RSD [%]) der QC-Proben über den gesamten Messzeitraum (\* Dreifachinjektion)

Konzentration [ng/mL]	n	Mittelwert	SD	RE [%]	RSD [%]
1*	8	1,00	0,01	1,71	1,22
2*	11	2,18	0,17	8,78	7,66
5*	10	5,03	0,22	0,51	4,32
10*	7	10,08	0,51	0,78	5,09
10	80	9,32	0,94	-6,79	10,12
20	96	19,46	1,41	-2,72	7,25
40	101	38,78	2,42	-3,05	6,25

Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse der QC- Proben entsprachen den Anforderungen an bioanalytische Untersuchungsmethoden (s. Kap. 2.5.1).

Die von *Kloft et al.* und *Pieck* übernommene Methode konnte somit erfolgreich an die Bestimmung von Platin-DNA-Addukten in Tumorzellen adaptiert werden.

### 3.2.1 Einfluss von Ribonuclease auf die DNA-Platinierung

Mit dem verwendeten DNA-Isolierungsverfahren (QIAamp®-System) ist eine Differenzierung zwischen RNA und DNA nicht möglich. Da die untersuchten Zellen sowohl DNA als auch RNA enthielten, war es denkbar, dass bei der Isolierung der DNA auch RNA miterfasst wurde und die enthaltenen Platin-RNA-Addukte das Ergebnis für die Platin-DNA-Addukte verfälschten.

Um den Anteil von RNA-Addukten in den Proben zu charakterisieren, wurde während der Lyse der Zellen ein Abbau der RNA durch Ribonuclease (RNase) durchgeführt. Diese wurde laut Qiagen-Vorschrift im Überschuss zugegeben, um zu vermeiden, dass sie durch die für die Lyse der Zellen eingesetzte Protease sofort abgebaut und so inaktiviert wurde. In einer vergleichenden Untersuchung wurden 8 Aliquote des Inkubationsansatzes *mit* und weitere 8 Aliquote *ohne* den Zusatz von RNase bearbeitet und die DNA-Menge bestimmt. Außerdem wurde bei verschiedenen Inkubationskonzentrationen die DNA-Platinierung bestimmt. Das Platin-Nukleotid-Verhältnis ohne RNase wurde für jede Konzentration = 100 % gesetzt und die Veränderung nach Einsatz von RNase darauf bezogen (siehe auch Anhang B). Die berechneten DNA-Mengen und Platin-Nukleotid-Verhältnisse sind in Abb. 3.7 dargestellt.

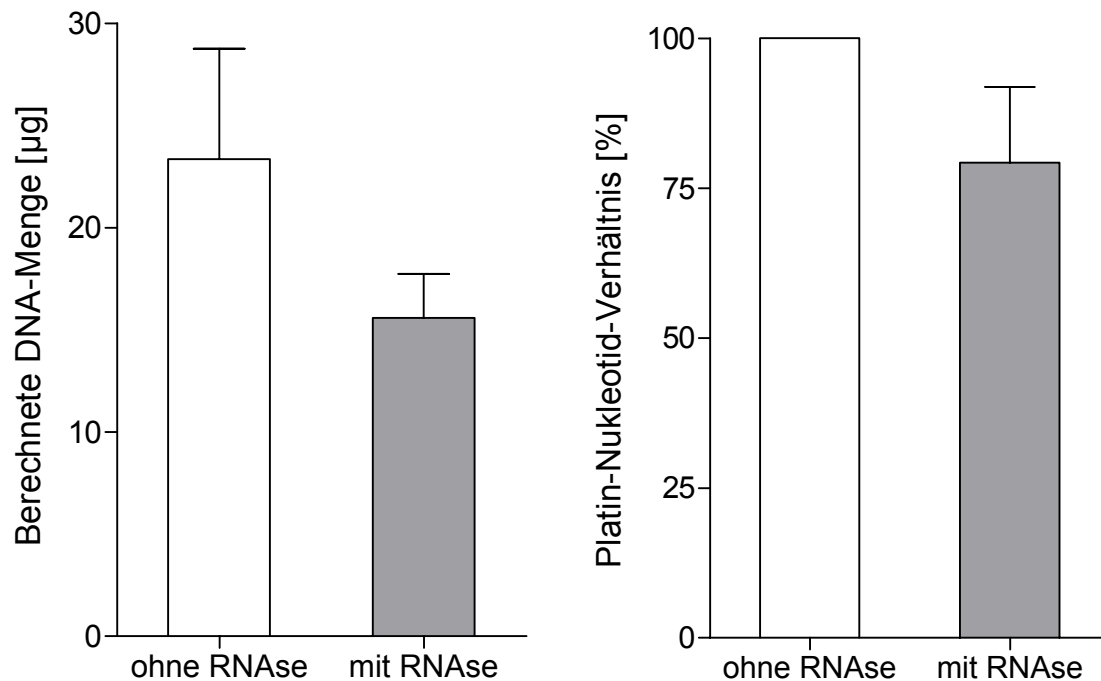


Abb. 3.7 Einfluss von RNase auf die berechnete DNA-Menge ( $n = 8$ ) und das Platin-Nukleotid-Verhältnis ( $n = 6$ )

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Einsatz von RNase einen signifikanten ( $p < 0,01$ ) Einfluss auf die berechnete DNA-Menge hat. Ohne den Einsatz von RNase würde RNA fälschlicherweise als DNA mitbestimmt. Da auch an der RNA Addukte gebildet werden, ist der Unterschied beim Platin-Nukleotid-Verhältnis zwar nicht so stark ausgeprägt, aber eine Abnahme der Addukte bei Einsatz von RNase ist zu erkennen und ist signifikant ( $p < 0,01$ ). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde bei allen Untersuchungen während der Lyse der Zellen RNase zugesetzt. Damit war gewährleistet, dass das Platin-Nukleotid-Verhältnis ein Maß für die DNA- und nicht RNA-Adduktbildung ist.

### 3.2.2 Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit

Zur Untersuchung der Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit wurden Zellen der Zelllinie 2102 für unterschiedliche Zeiten mit unterschiedlichen Konzentrationen Cisplatin inkubiert. Die Inkubationsdauer und Inkubationskonzentrationen basierten auf einer Literaturrecherche (vgl. Tab. 2.2). Die Ergebnisse (vgl. Anhang B) sind in Abb. 3.8 dargestellt.

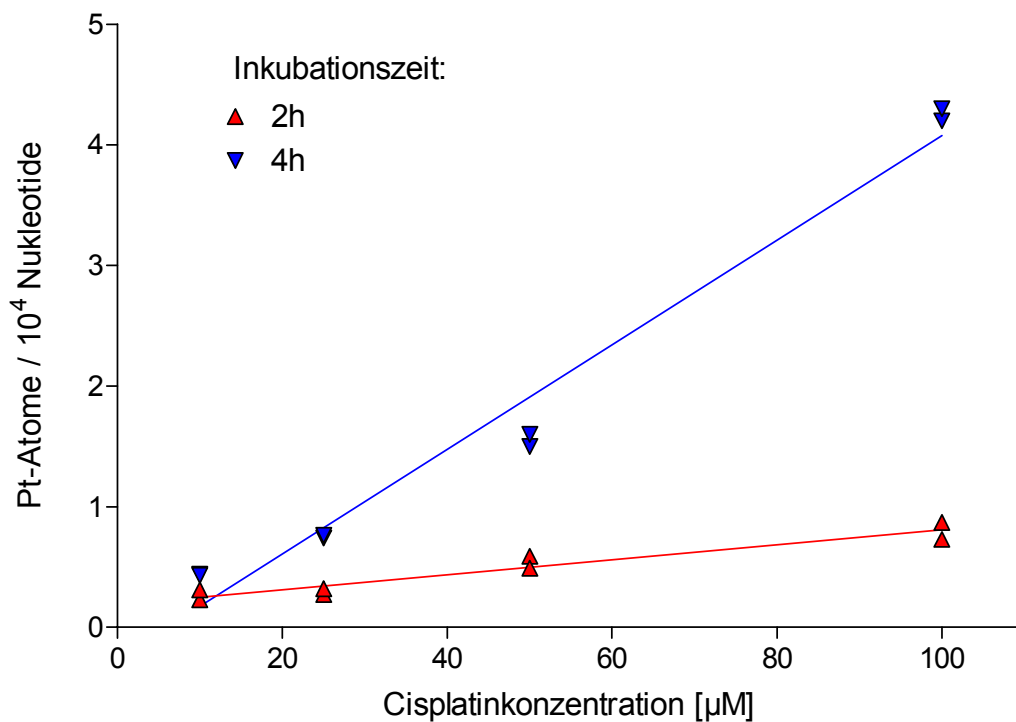


Abb. 3.8 Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Platin-DNA-Adduktbildung in der Hodenkarzinomzelllinie 2102

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Platin-DNA-Adduktbildung sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig ist. Mit steigender Cisplatinkonzentration und längerer Inkubationsdauer steigt das Ausmaß der DNA-Platinierung. Damit genügend Platin an die DNA bindet und somit die Platinkonzentrationen oberhalb der Bestimmungsgrenze liegen, wurde für weitere Untersuchungen der DNA-Platinierung eine Inkubationsdauer von 4 h gewählt.

### 3.2.3 DNA-Platinierung verschiedener Zelllinien

Die DNA-Platinierung ist ein wichtiger Faktor für die Zytotoxizität von Cisplatin und kann bei resistenten Zellen verändert sein. Daher wurden die verwendeten Zelllinien auf das Ausmaß ihrer Adduktbildung nach Inkubation mit Cisplatin untersucht. Die Untersuchung erfolgte jeweils an den Zelllinienpaaren 2102 / 2102 Klon B, A2780 / A2780 cis und HeLa / HeLa CK. Die Ergebnisse (vgl. Anhang B) sind im Folgenden graphisch dargestellt.

### Hodenkarzinomzellen 2102 und 2102 Klon B

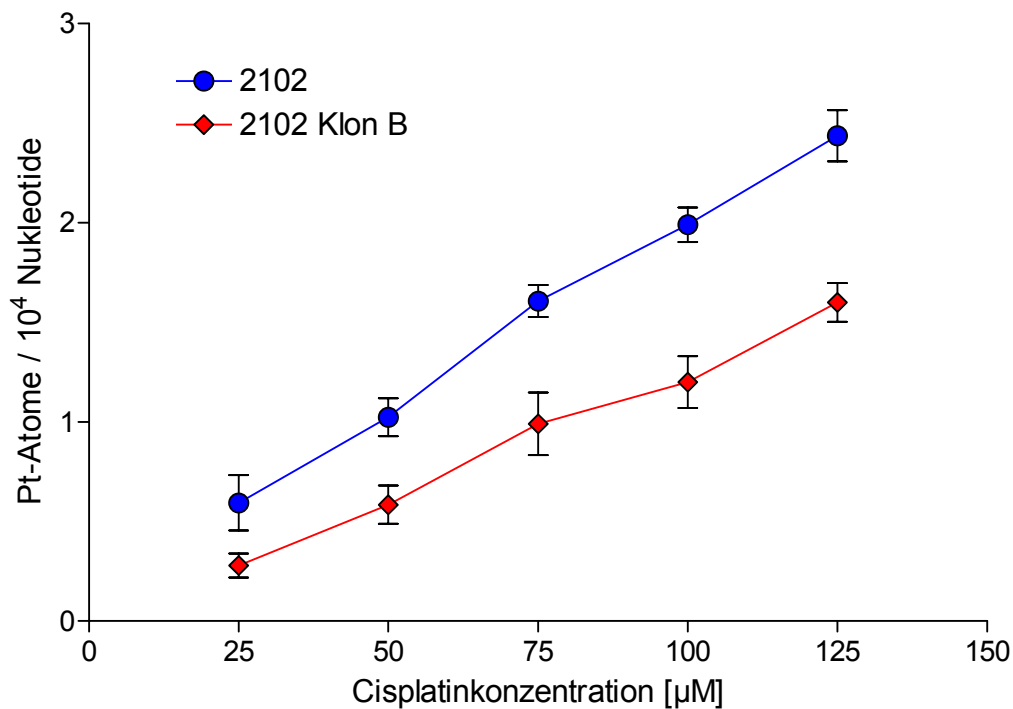


Abb. 3.9 Platin-DNA-Adduktbildung in der cisplatinempfindlichen und -resistenten Hodenkarzinomzelllinie (MW  $\pm$  SD, n = 3)

In Abb. 3.9 ist zu erkennen, dass die cisplatinresistente Zelllinie 2102 Klon B weniger Pt-DNA-Addukte bildete, als die parentale Zelllinie 2102. Dieser Unterschied bestand bei allen eingesetzten Cisplatinkonzentrationen. In Tab. 3.3 sind die Unterschiede der DNA-Platinierung zwischen sensibler und resistenter Zelllinie bei den unterschiedlichen Cisplatinkonzentrationen dargestellt.

Tab. 3.3 Verhältnis der Adduktbildung 2102 / 2102 Klon B

Cisplatinkonz. [μM]	25	50	75	100	125	MW
2102 / 2102 Klon B	2,1	1,7	1,6	1,6	1,5	1,7

Die resistente Zelllinie 2102 Klon B bildete im Mittel ca. 1,7-mal weniger Addukte als die parentale Zelllinie 2102.



### Ovarialkarzinomzellen A2780 und A2780 cis

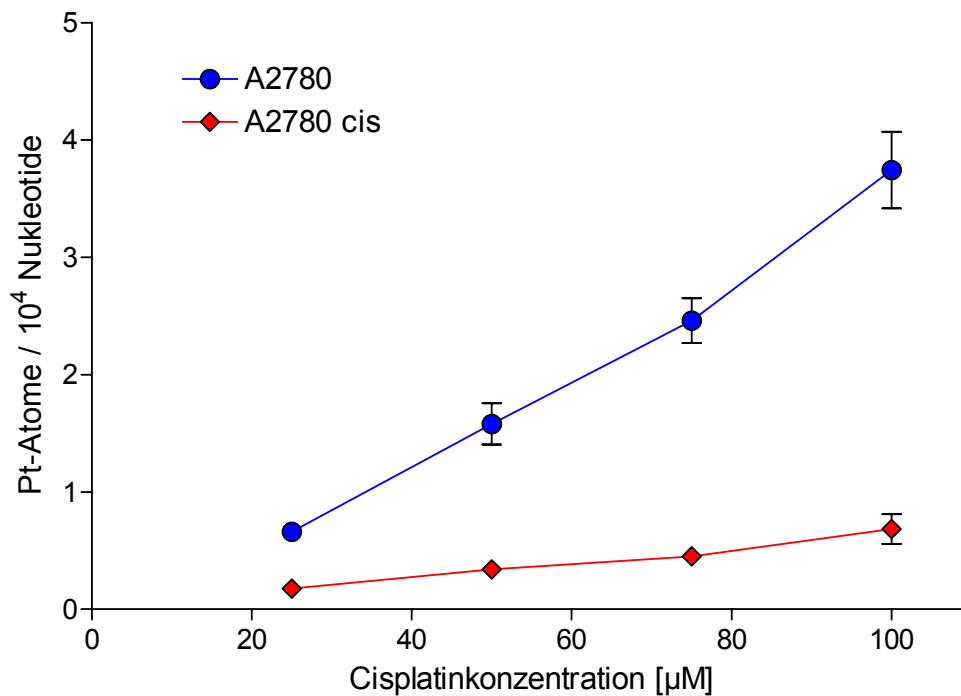


Abb. 3.10 Platin-DNA-Adduktbildung in der cisplatin-sensitiven und -resistenten Ovarialkarzinomzelllinie (MW  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). Die SD war teilweise so niedrig, dass sie in der Grafik durch das Symbol überdeckt wird.

Die Abb. 3.10 zeigt die Unterschiede im Ausmaß der DNA-Platinierung bei dem Zelllinienpaar A2780 und A2780 cis. Hier ist ebenfalls zu erkennen, dass die cisplatinresistente Variante weniger Addukte bildet als die sensitive Zelllinie A2780. Tab. 3.4 zeigt, um welchen Faktor sich die Adduktbildung in cisplatin-sensitiver und -resistenter Zelllinie unterscheidet.

Tab. 3.4 Verhältnis der Adduktbildung A2780 / A2780 cis

Cisplatin-konz. [ $\mu\text{M}$ ]	25	50	75	100	MW
A2780 / A2780 cis	4,7	5,0	6,1	5,8	5,4

Das mittlere Verhältnis der Platin-DNA-Adduktbildung A2780 / A2780 cis betrug 5,4 und war damit wesentlich höher als bei 2102 / 2102 Klon B.

Wie in Kap. 3.1.2 beschrieben, veränderten sich die Zellen bei längerer Kultivierung und hatten nur noch einen Resistenzgrad von 2,0. Bei diesen Zellen wurde ebenfalls die DNA-Platinierung untersucht. Die Ergebnisse in Abb. 3.11 dargestellt.

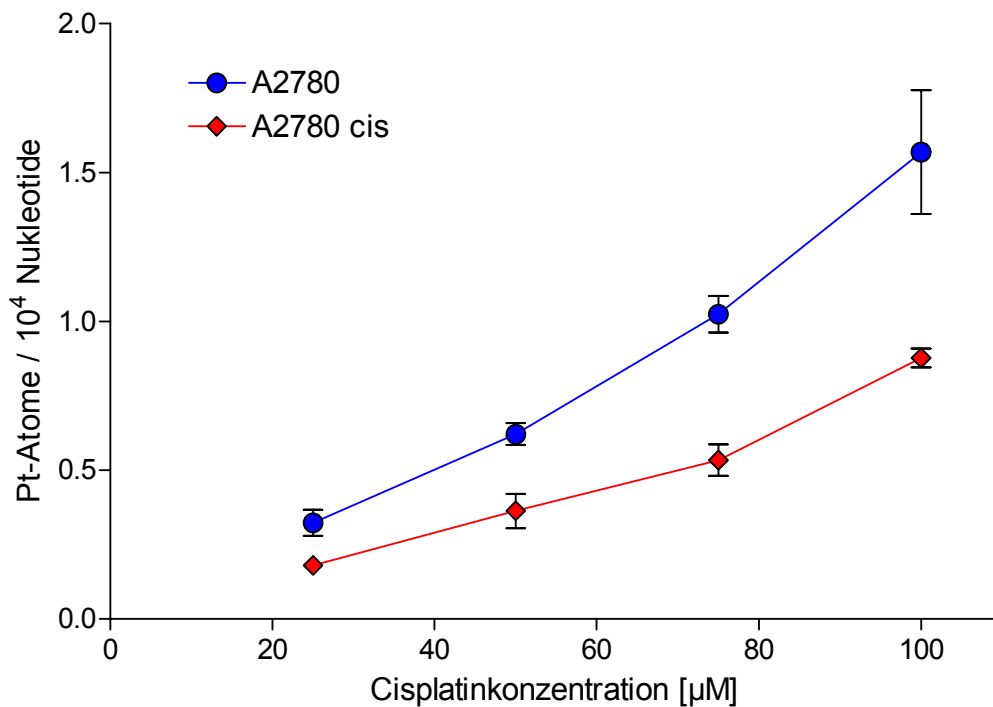


Abb. 3.11 Platin-DNA-Adduktbildung in der cisplatinsensitiven und -resistenten Ovariakarzinomzelllinie nach längerer Kultivierung (MW  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). Die SD war teilweise so niedrig, dass sie in der Grafik durch das Symbol überdeckt wird

Hier zeigte sich ebenfalls ein deutlicher Unterschied zwischen cisplatinsensitiver und -resistenter Zelllinie. Die cisplatinresistente Zelllinie bildete weniger Addukte als die cisplatinsensitive, jedoch war der Unterschied geringer als zuvor in Abb. 3.10 ersichtlich. Den geringeren Unterschied zeigt auch Tab. 3.5.

Tab. 3.5 Verhältnis der Adduktbildung A2780 / A2780 cis nach längerer Kultivierung

Cisplatinkonz. [µM]	25	50	75	100	MW
A2780 / A2780 cis	1,8	1,7	1,9	1,8	1,8

## Zervixkarzinomzellen HeLa und HeLa CK

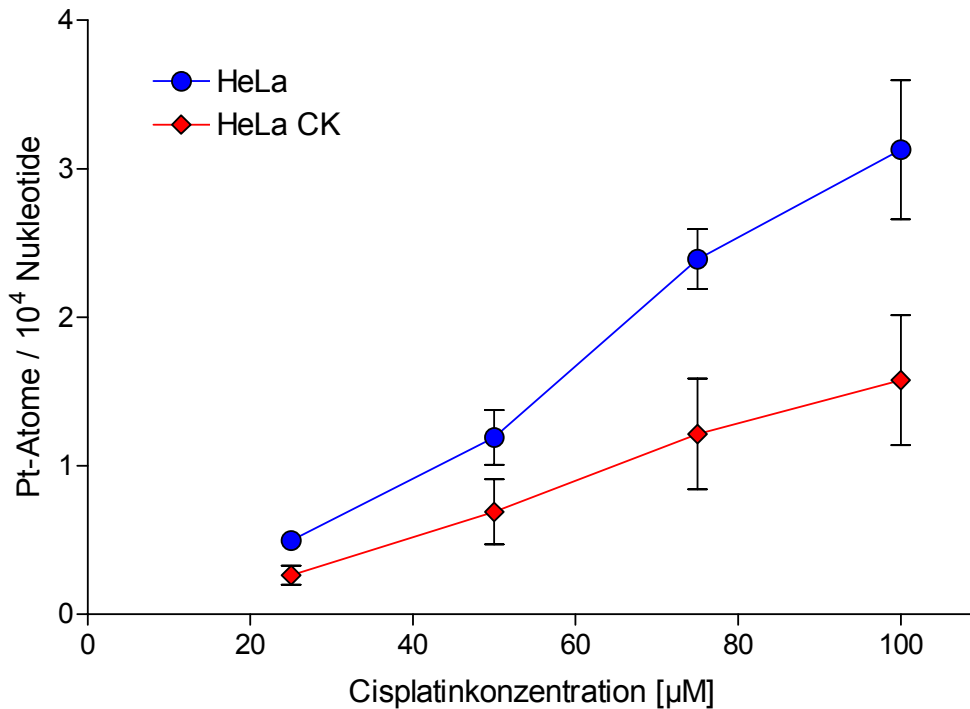


Abb. 3.12 *Platin-DNA-Adduktbildung in der cisplatinsensitiven und -resistenten Zervixkarzinomzelllinie (MW ± SD, n = 5-6). Die SD war teilweise so niedrig, dass sie in der Grafik durch das Symbol überdeckt wird.*

Wie bei den beiden vorangegangenen Zelllinienpaaren zeigte sich auch bei dem Zelllinienpaar HeLa / HeLa CK ein Unterschied im Ausmaß der DNA-Platinierung nach Inkubation mit Cisplatin (s. Abb. 3.11). Das mittlere Adduktverhältnis zwischen den beiden Zelllinien betrug 1,9 (s. Tab. 3.6 ).

Tab. 3.6 *Verhältnis der Adduktbildung HeLa / HeLa CK*

Cisplatin [μM]	25	50	75	100	MW
HeLa / HeLa CK	1,9	1,7	2,0	2,0	1,9

### 3.2.4 DNA-Platinierung und Resistenzgrad

Um zu überprüfen, ob sich die DNA-Platinierung als zentraler Parameter zur Charakterisierung der Platinsensitivität eignet, wurde das unterschiedliche Verhältnis der Adduktbildung in den Zelllinien mit deren Resistenzgrad verglichen. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.7 dargestellt.

*Tab. 3.7 Gegenüberstellung des mittleren Adduktverhältnisses mit dem Resistenzgrad*

Zelllinienpaar	Mittleres Adduktverhältnis	Resistenzgrad
2102 / 2102 Klon A	1,7	1,9
A2780 / A2780 cis	5,4	5,4
A2780 / A2780 cis (nach längerer Kultivierung)	1,8	2,0
HeLa / HeLa CK	1,9	3,6

Die Ergebnisse zeigen, dass bei dem Zelllinienpaar 2102 / 2102 Klon B und A2780 / A2780 cis das mittlere Adduktverhältnis den Resistenzgrad widerspiegelt. Bei dem Zelllinienpaar HeLa / HeLa CK ist dieser Zusammenhang weniger ausgeprägt. Bei A2780 / A2780 cis wird deutlich, dass eine Verringerung der Resistenzgrades auch eine Verringerung des mittleren Adduktverhältnisses zur Folge hat.

### 3.3 Quantifizierung der DNA-Reparaturgeschwindigkeit

Veränderungen im Ausmaß der DNA-Platinierung können auch durch eine veränderte Reparaturkinetik bedingt sein. Daher wurde untersucht, ob und wie sich das Platin-Nukleotid-Verhältnis verändert, wenn über verschieden lange Zeit nach der Inkubation mit Cisplatin mit frischem, cisplatinfreiem Medium inkubiert wird. DNA-Reparatur setzt in den Zellen schon nach kurzer Zeit ein, sodass ein relativ kurzer Untersuchungszeitraum gewählt wurde. Ein Untersuchungszeitraum von vielen Stunden bis Tagen wäre problematisch gewesen, weil durch die relativ hohe Cisplatinkonzentration zu Beginn trotz anschließender Inkubation mit cisplatinfreiem Medium nach dieser Zeit schon viele Zellen tot gewesen wären. Die DNA-Reparatur wurde in den Zelllinienpaaren A2780 / A2780 cis und HeLa / HeLa CK quantifiziert (vgl. Anhang C).

### 3.3.1 DNA-Reparatur in Ovarialkarzinomzellen A2780 und A2780 cis

Die Veränderungen der DNA-Platinierung nach einer Reparaturzeit von bis zu 8 Stunden in dem Zelllinienpaar A2780 und A2780 cis sind in Abb. 3.13 dargestellt.

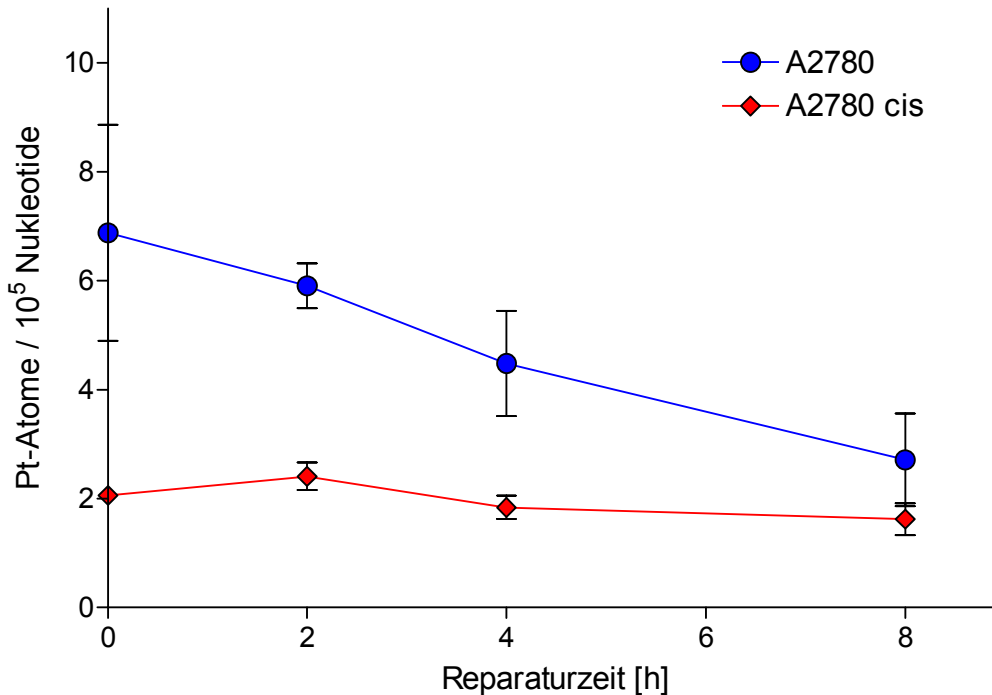
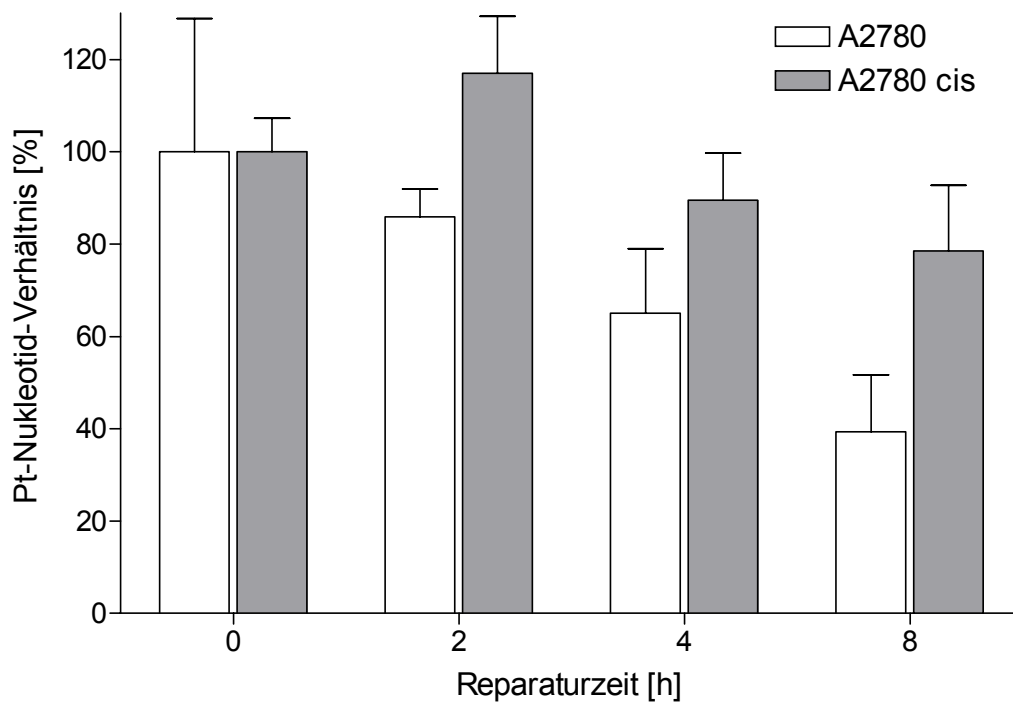


Abb. 3.13 Veränderung der DNA-Platinierung nach Inkubation mit cisplatinfreiem Medium in A2780- und A2780 cis-Zellen ( $MW \pm SD$ ,  $n = 3$ ); Vorinkubation beider Zelllinien mit  $100 \mu\text{M}$  Cisplatin für 2 h

Bei der sensitiven Zelllinie A2780 ist eine deutliche, nahezu lineare Abnahme des Platin-Nukleotid-Verhältnisse zu erkennen. Bei der resistenten Zelllinie A2780 cis ist nur eine geringfügige Abnahme sichtbar.

Da für diese Untersuchung in beiden Zelllinien die gleiche Cisplatinkonzentration ( $100 \mu\text{M}$ ) zur Inkubation eingesetzt wurde, sind die anfänglichen Platin-Nukleotid-Verhältnisse unterschiedlich (vgl. Kap. 3.2.3).

Um einen besseren Eindruck von den Veränderungen durch DNA-Reparatur zu bekommen, wurden die Ergebnisse auch prozentual dargestellt bezogen auf das Platin-Nukleotid-Verhältnis direkt nach Ende der Cisplatin-Inkubation (s. Abb. 3.14).



**Abb. 3.14** Prozentuale Veränderung der DNA-Platinierung nach Inkubation mit cisplatinfreiem Medium in A2780- und A2780 cis-Zellen ( $MW \pm SD$ ,  $n = 3$ ); Vorinkubation beider Zelllinien mit  $100 \mu\text{M}$  Cisplatin für 2 h

In dieser Abbildung wird deutlich, dass in der sensitiven Zelllinie nach 8 Stunden das Platin-Nukleotid-Verhältnis um mehr als 50 % zurückgegangen ist. Bei der resistenten Zelllinie stieg das Ausmaß der Adduktbildung nach 2 Stunden an und fiel dann erst ab, jedoch ging nach 8 Stunden das Platin-Nukleotid-Verhältnis nur um ca. 20 % zurück.

Da bei diesem Versuch das Ausgangsniveau der Platin-Nukleotid-Verhältnisse sehr unterschiedlich war, sollte in einem weiteren Experiment versucht werden, das Ausmaß der Adduktbildung in beiden Zellen auf ein gleiches bzw. ähnliches Anfangsniveau zu bringen. Dazu wurde die resistente Zelllinie mit einer vierfach höheren Cisplatin-konzentration ( $400 \mu\text{M}$ ) inkubiert. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Abb. 3.15 dargestellt.

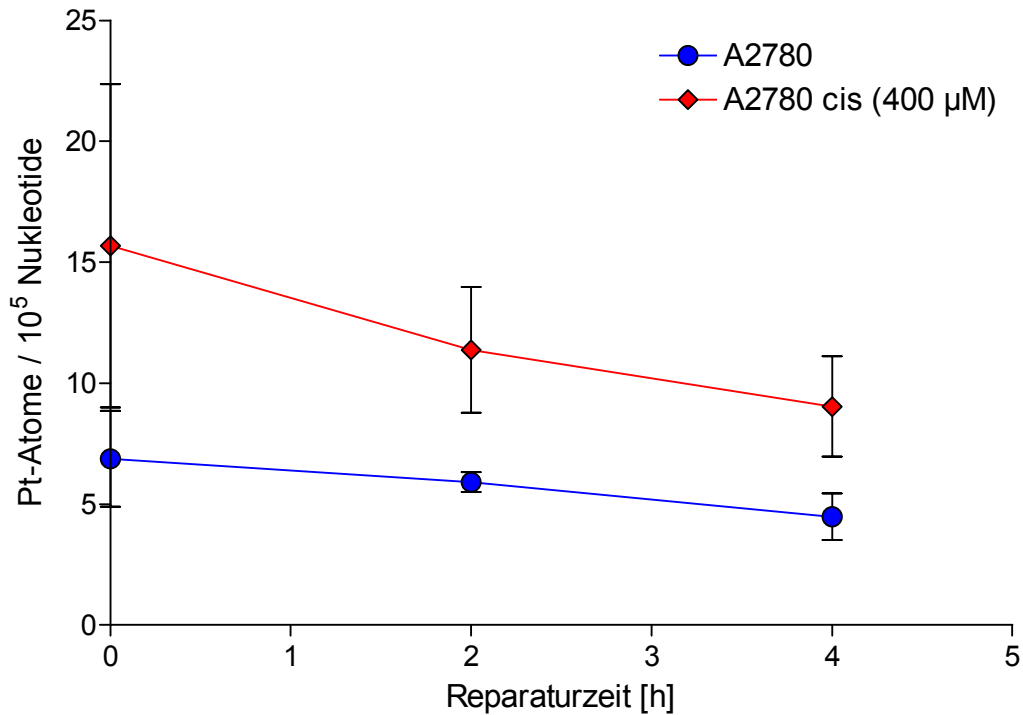


Abb. 3.15 Veränderung der DNA-Platinierung nach Inkubation mit cisplatinfreiem Medium; A2780 mit 100 µM und A2780 cis mit 400 µM Cisplatin vorinkubiert (MW ± SD, n = 3)

Das Ziel die Anfangsniveaus anzugleichen, konnte nicht erreicht werden. Eine vierfach höhere Cisplatinkonzentration ergab bei den resistenten Zellen ein fast achtfach höheres Platin-Nukleotid-Verhältnis. Jedoch war bei diesem höheren Anfangsniveau eine stärkere Abnahme der Addukte bei den resistenten Zellen zu erkennen als im ersten Versuch (s. Abb. 3.13 und Abb. 3.14). Die prozentuale Darstellung in Abb. 3.16 macht dies noch deutlicher.

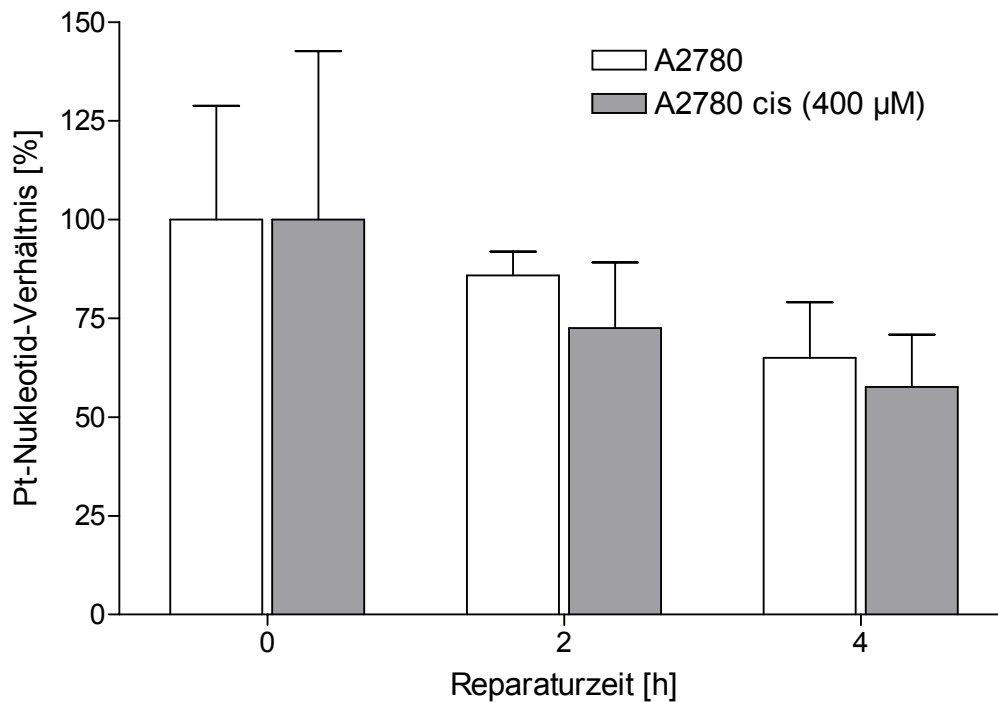


Abb. 3.16 Prozentuale Veränderung der DNA-Platinierung nach Inkubation mit cisplatinfreiem Medium; A2780 mit 100 µM und A2780 cis mit 400 µM Cisplatin vorinkubiert (MW ± SD, n = 3)

Die prozentuale Betrachtung der Addukt-Abnahme zeigt, dass hier die Reparatur in ähnlicher Größenordnung erfolgte und dass bei der resistenten Zelllinie A2780 cis im Mittel die Abnahme des Platin-Nukleotid-Verhältnisses sogar etwas deutlicher ausfiel.

### 3.3.2 DNA-Reparatur in Zervixkarzinomzellen HeLa und HeLa CK

Die Veränderungen der DNA-Platinierung nach verschiedenen Reparaturzeiten wurden auch bei dem Zelllinienpaar HeLa und HeLa CK untersucht. Um gleich von Beginn an ein vergleichbares Anfangsniveau beim Platin-Nukleotid-Verhältnis zu erlangen, wurden die sensitiven HeLa-Zellen mit 100 µM und die resistenten HeLa CK-Zellen mit 200 µM Cisplatin vorinkubiert. Die daraus resultierenden Ergebnisse sind in Abb. 3.17 dargestellt.



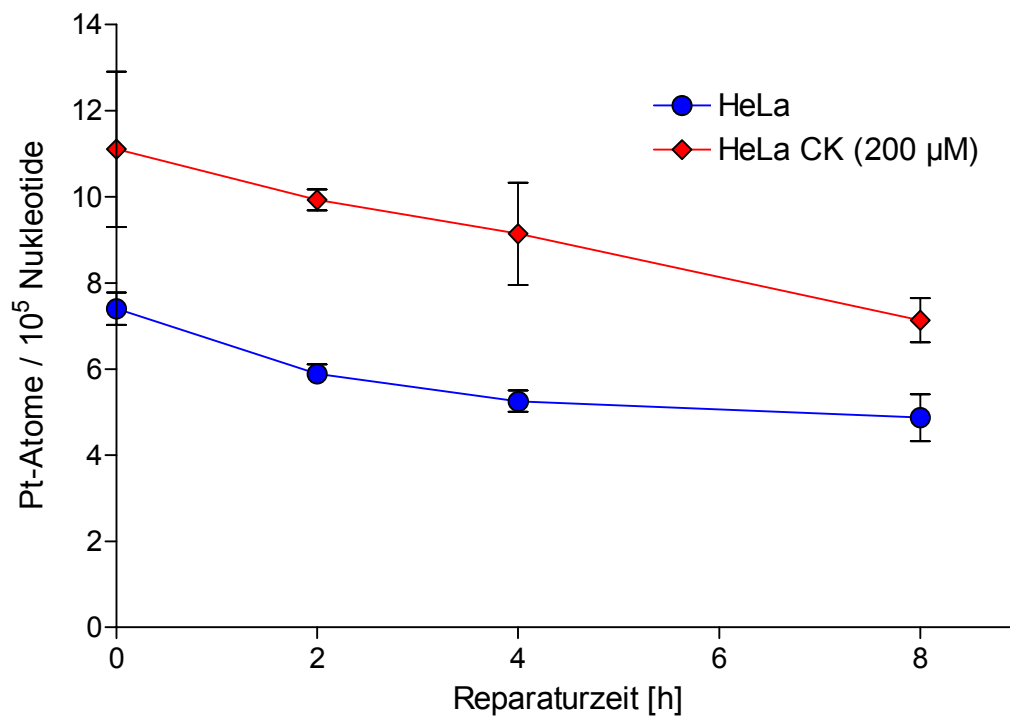


Abb. 3.17 Veränderung der DNA-Platinierung nach Inkubation mit cisplatinfreiem Medium; HeLa mit 100 µM und HeLa CK mit 200 µM Cisplatin vorinkubiert (MW ± SD, n = 3)

Das Angleichen der Anfangsniveaus war auch hier nicht gelungen, jedoch lagen die Adduktverhältnisse in vergleichbarer Größenordnung. Es ist erkennbar, dass in beiden Zelllinien mit der Zeit eine Abnahme des Platin-Nukleotid-Verhältnisses stattfand. Die durch die Mittelwerte gezeichneten Kurven verliefen annähernd parallel.

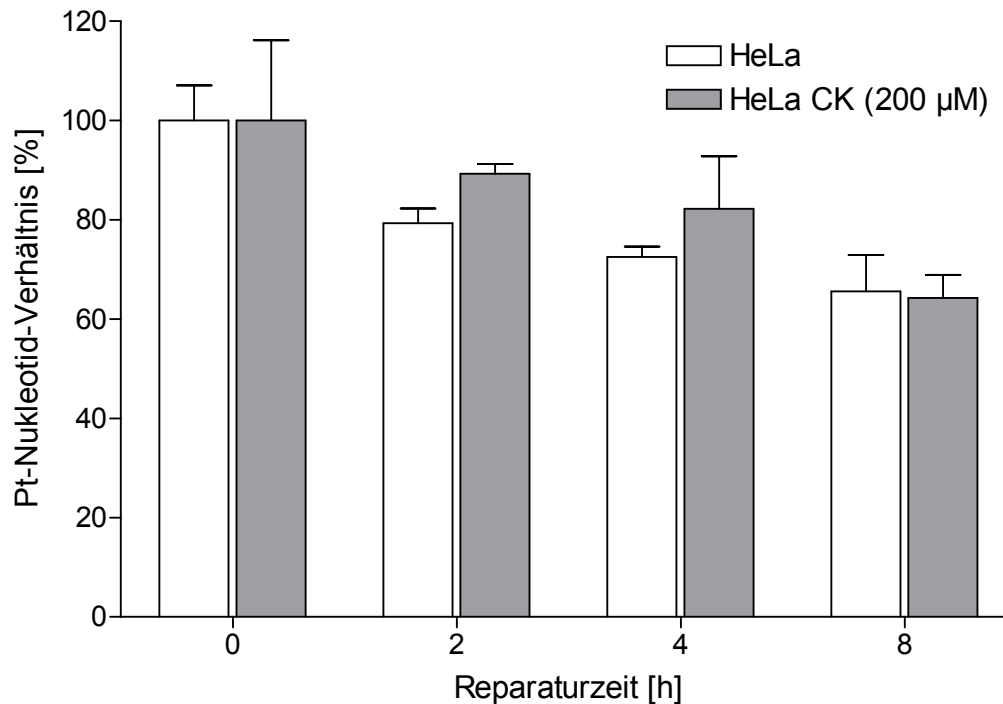


Abb. 3.18 *Prozentuale Veränderung der DNA-Platinierung nach Inkubation mit cisplatinfreiem Medium; HeLa mit 100 µM und HeLa CK mit 200 µM Cisplatin vorinkubiert (MW ± SD, n = 3)*

Die prozentuale Darstellung (Abb. 3.17) verdeutlicht, dass das Platin-Nukleotid-Verhältnis in den sensitiven Zellen in den ersten 4 Stunden geringfügig stärker abnahm als in den resistenten Zellen. Nach 8 Stunden Reparaturzeit war jedoch kein Unterschied mehr erkennbar; bei beiden Zelllinien haben die Platin-Nukleotid-Verhältnisse um ca. 30 % abgenommen.

### 3.4 Quantifizierung der intrazellulären Platinkonzentrationen

Ein Parameter, der entscheidenden Einfluss auf das Ausmaß der Platin-DNA-Adduktbildung hat, ist die intrazelluläre Platinkonzentration. Wenn eine Zelle verringert Cisplatin aufnimmt bzw. rasch wieder eliminiert, steht auch weniger Platin für die Bindung an die DNA zur Verfügung. Daher wurden die intrazellulären Platin-konzentrationen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit Cisplatin (Uptake) und anschließender Inkubation mit cisplatinfreiem Medium (Efflux) in den Zelllinienpaaren A2780 / A2780 cis und HeLa / HeLa CK untersucht. Die Ergebnisse (vgl. Anhang D) für Uptake und Efflux sind im Folgenden dargestellt.

### 3.4.1 Uptake

Zur Untersuchung des Uptake wurden die Zellen für 2, 5, 10, 60 und 120 min mit 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin inkubiert. Vor dem Versuch wurden die Zellzahl und daraus das Zellvolumen der Probe bestimmt. Die gemessenen Platinkonzentrationen wurden in absolute Platinkonzentrationen umgerechnet und konnten dann auf das Zellvolumen bezogen werden, so dass sich eine Platinkonzentration pro Zellvolumen ergab.

#### Ovarialkarzinomzellen A2780 und A2780 cis

Die intrazellulären Platinkonzentrationen der cisplatinempfindlichen und -resistenten Zelllinien A2780 und A2780 cis sind in Abb. 3.19 dargestellt.

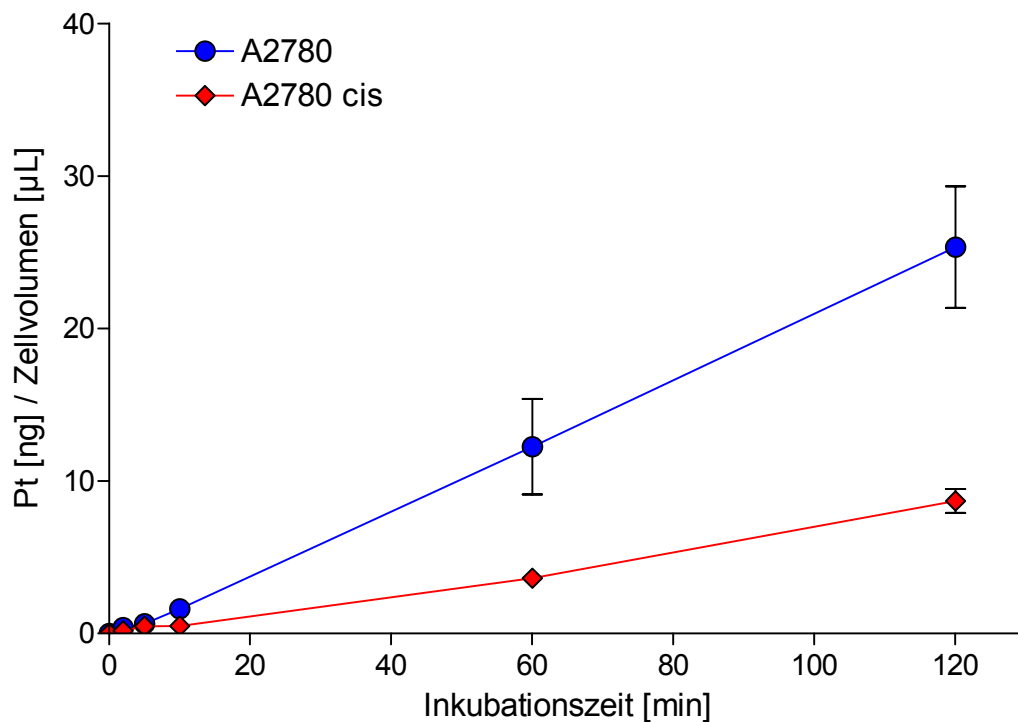


Abb. 3.19 Intrazelluläre Platinkonzentration während der Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin in A2780- und A2780 cis-Zellen ( $MW \pm SD$ ,  $n = 3$ ). Die SD war teilweise so niedrig, dass sie in der Grafik durch das Symbol überdeckt wird.

Es ist deutlich zu erkennen, dass bei beiden Zelllinien die intrazelluläre Platin-konzentration mit steigender Inkubationszeit linear ansteigt. Jedoch ist der Verlauf bei der cisplatinresistenten Zelllinie A2780 cis wesentlich flacher, als bei der cisplatinempfindlichen Zelllinie A2780. Um den Kurvenverlauf bei kurzen Inkubationszeiten („early uptake“) besser beurteilen zu können, sind in Abb. 3.20 die Ergebnisse der ersten 10 min dargestellt.

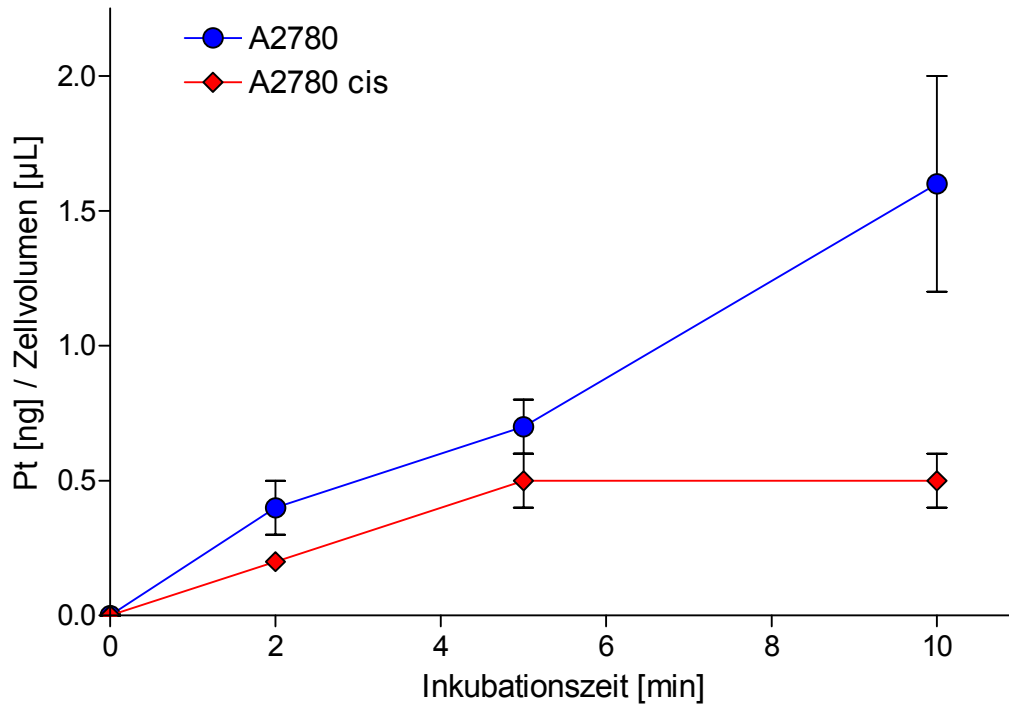


Abb. 3.20 Intrazelluläre Platinkonzentration während der Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin in A2780- und A2780 cis-Zellen; Ausschnitt bis  $t = 10 \text{ min}$  ( $MW \pm SD$ ,  $n = 3$ ). Die SD war teilweise so niedrig, dass sie in der Grafik durch das Symbol überdeckt wird.

Es zeigt sich, dass die Kurven für beide Zelllinien in den ersten 5 min sehr ähnlich verliefen. Erst danach kam es zu einer deutlichen Kurventrennung und die Platinkonzentrationen in den sensitiven Zellen stiegen deutlich stärker an als in den resistenten Zellen. Wie Abb. 3.19 zeigt, setzte sich dieser stärkere Anstieg auch bis 120 min stetig fort. Um die Unterschiede in den Platinkonzentrationen zu quantifizieren, wurden diese für jeden Zeitpunkt ins Verhältnis gesetzt und daraus der Mittelwert berechnet (s. Tab. 3.8).

Tab. 3.8 Verhältnis der intrazellulären Platinkonzentrationen in A2780 / A2780 cis-Zellen

Inkubationszeit [min]	2	5	10	60	120	MW
A2780 / A2780 cis	2,2	1,4	3,3	3,4	3,0	2,7

Die intrazelluläre Platinkonzentration ist in der sensitiven Zelllinie durchschnittlich 2,7-mal so hoch wie in der resistenten Zelllinie.

### Zervixkarzinomzellen HeLa und HeLa CK

Die Ergebnisse der Untersuchung der intrazellulären Platinkonzentration nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit Cisplatin sind für das Zelllinienpaar HeLa / HeLa CK in Abb. 3.21 dargestellt.

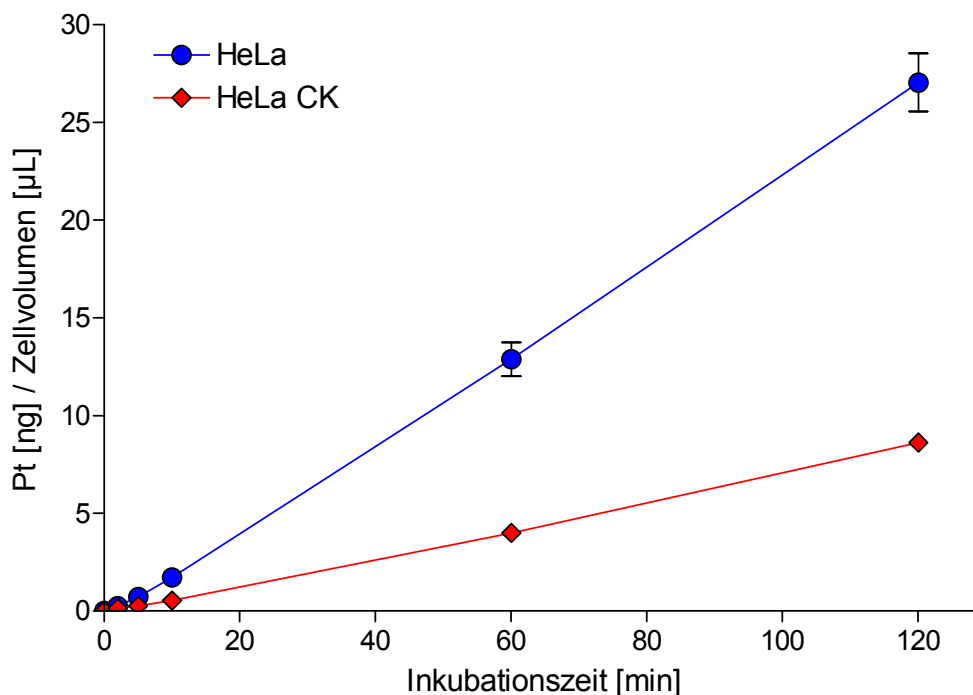


Abb. 3.21 Intrazelluläre Platinkonzentration während der Inkubation mit 100  $\mu$ M Cisplatin in HeLa- und HeLa CK-Zellen ( $MW \pm SD$ ,  $n = 3$ ). Die SD war teilweise so niedrig, dass sie in der Grafik durch das Symbol überdeckt wird.

Auch bei diesem Zelllinienpaar ist mit steigender Inkubationszeit ein linearer Anstieg der intrazellulären Platinkonzentrationen zu erkennen. Bei den resistenten Zellen HeLa CK wurde zu allen Zeitpunkten eine deutlich geringere Platinkonzentration gemessen.

Zur besseren Veranschaulichung sind die ersten 10 min in Abb. 3.22 separat dargestellt.

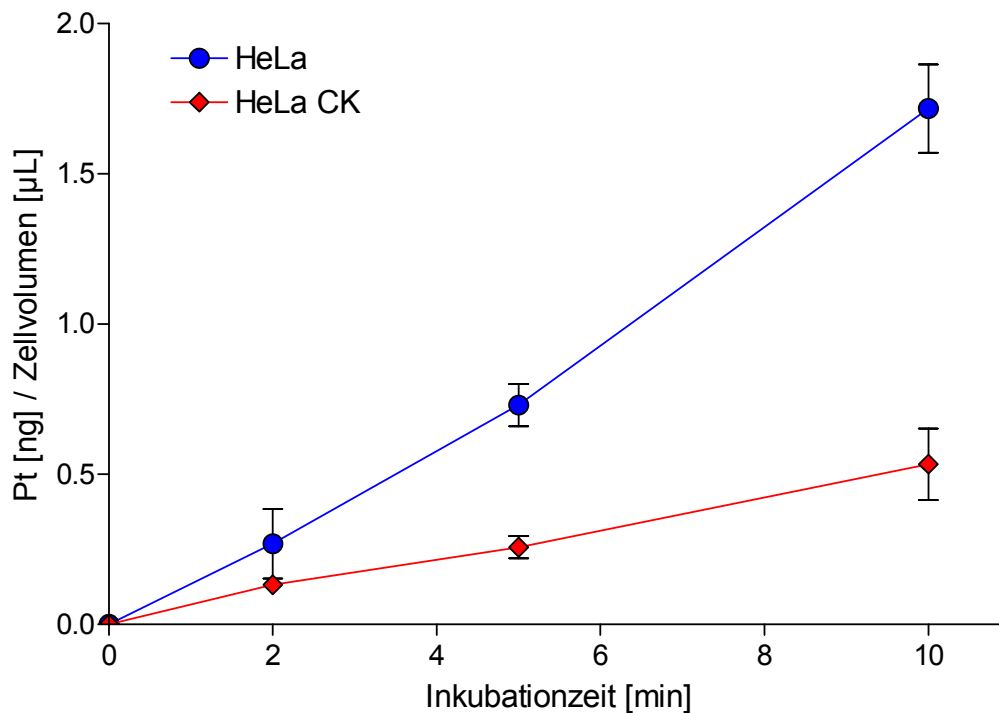


Abb. 3.22 Intrazelluläre Platinkonzentration während der Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin in HeLa- und HeLa CK-Zellen; Ausschnitt bis  $t = 10$  min (MW  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). Die SD war teilweise so niedrig, dass sie in der Grafik durch das Symbol überdeckt wird.

Bei diesem Zelllinienpaar zeigt sich, dass die Unterschiede in der intrazellulären Platin-konzentration schon nach den ersten 5 min sichtbar sind. In Tab. 3.9 sind die Unterschiede zu den einzelnen Zeitpunkten dargestellt. Die sensitiven Zellen haben durchschnittlich 4,4-mal höhere intrazelluläre Platinkonzentrationen als die resistenten Zellen.

Tab. 3.9 Verhältnis der intrazellulären Platinkonzentrationen in HeLa / HeLa CK-Zellen

Inkubationszeit [min]	2	5	10	60	120	MW
HeLa / HeLa CK	2,0	2,8	3,2	3,2	3,1	2,9

Die Ergebnisse zum Uptake von Cisplatin zeigen, dass in beiden untersuchten Zelllinienpaaren die resistenten Zellen deutlich weniger Platin akkumulierten als die

sensitiven Zellen. Dadurch konnte gezeigt werden, dass der Uptake von Cisplatin ein wichtiger Parameter zur Beurteilung der Platinsensitivität ist.

### 3.4.2 Efflux

Zur Untersuchung des Effluxes wurden die Zellen zunächst für 120 min mit 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin inkubiert und anschließend für 2, 5, 10 und 60 min mit neuem, cisplatinfreiem Medium inkubiert. Wie bei den Uptake-Versuchen wurden vor dem Versuch die Zellzahl und daraus das Zellvolumen der Probe bestimmt. Die gemessenen Platin-konzentrationen wurden in absolute Platinmengen umgerechnet und konnten dann auf das Zellvolumen bezogen werden, so dass sich eine Platinkonzentration pro Zellvolumen ergab.

#### Ovarialkarzinomzellen A2780 und A2780 cis

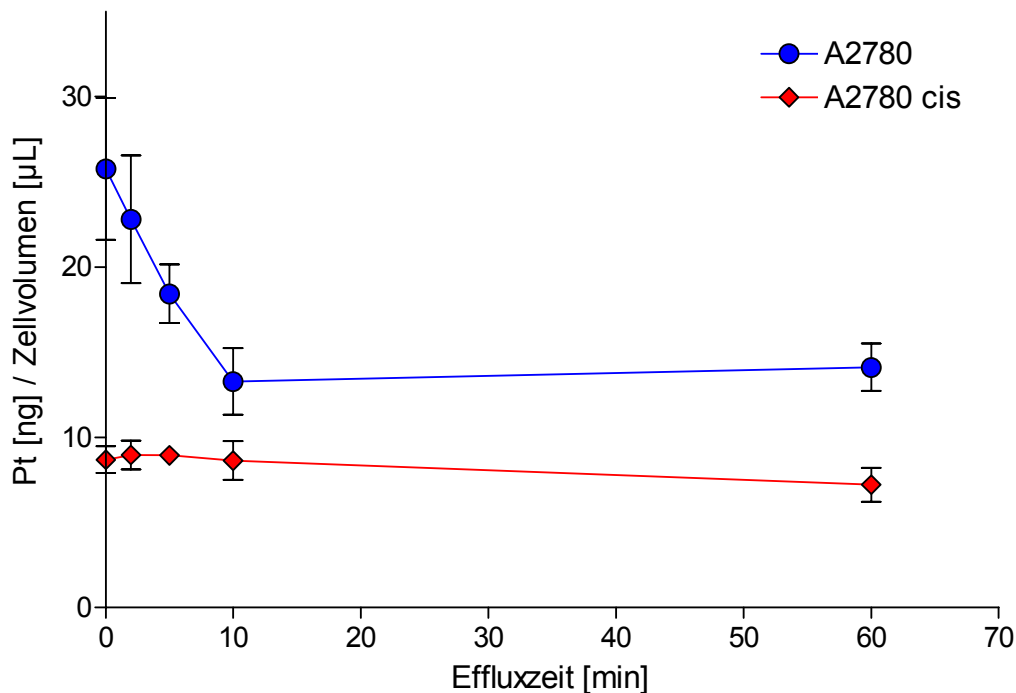
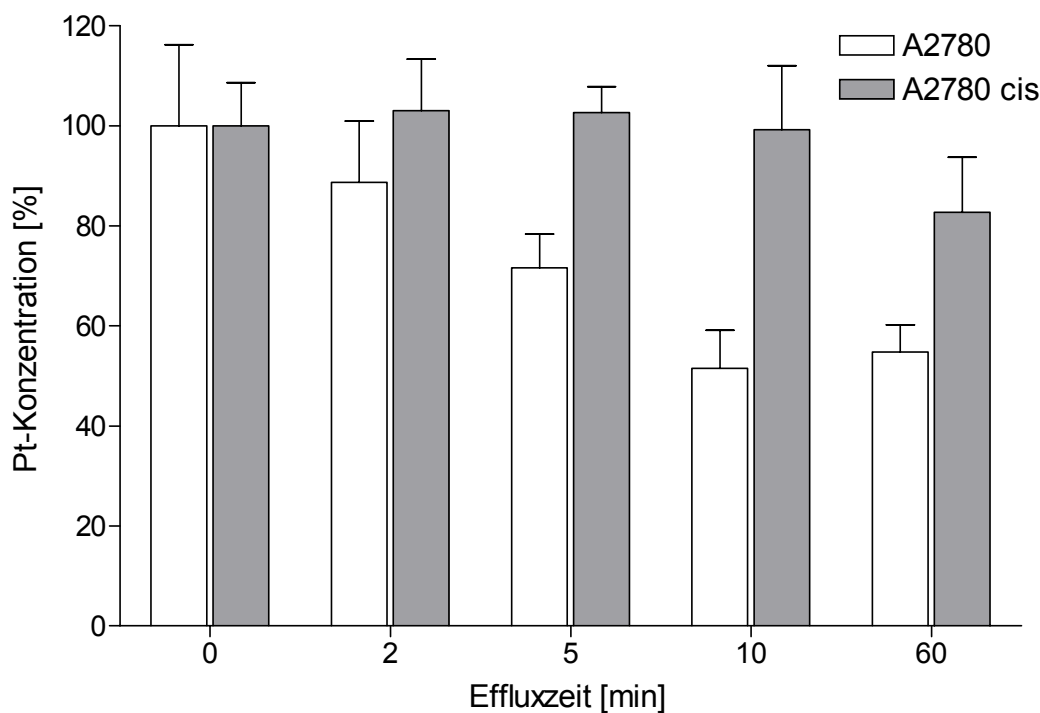


Abb. 3.23 Veränderung der intrazellulären Platinkonzentration nach Ende der Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin für 2 h in A2780- und A2780 cis-Zellen (MW  $\pm$  SD, n = 3) Die SD war teilweise so niedrig, dass sie in der Grafik durch das Symbol überdeckt wird.

In Abb. 3.23 sind die Ergebnisse für die intrazellulären Platinkonzentrationen nach zweistündiger Cisplatininkubation und anschließender Inkubation mit frischem Medium für das Zelllinienpaar A2780 / A2780 cis dargestellt. Bei den sensitiven Zellen kam es in den ersten zehn Minuten zu einem starken Abfall der Platinkonzentration, die sich auch nach 60 min noch auf diesem Niveau befand. Die Platinkonzentrationen bei den resistenten Zellen blieben hingegen nahezu gleich. Die unterschiedlichen Veränderungen der Platinkonzentrationen sind noch besser in der prozentualen Darstellung erkennbar (s. Abb. 3.24).



**Abb. 3.24** *Prozentuale Veränderung der intrazellulären Platinkonzentration nach Ende der Inkubation mit 100  $\mu$ M Cisplatin für 2 h in A2780- und A2780 cis-Zellen (MW  $\pm$  SD, n = 3)*

Die Platinkonzentration in den sensitiven Zellen fiel nach 10 min auf nur noch ca. 50 % des Ausgangswertes. Bei den resistenten Zellen blieb die Platinkonzentration in den ersten 10 min gleich; erst nach 60 min kam es zu einem leichten Abfall der Konzentration.

Ähnlich wie bei der Addukt-Reparatur waren die Ausgangskonzentrationen unterschiedlich und es wurde versucht, durch Erhöhung der Inkubationskonzentration bei den resistenten Zellen die Ausgangswerte anzugleichen. Dazu wurde die resistente



Zelllinie (A2780 cis) mit der dreifachen Cisplatinkonzentration ( $300 \mu\text{M}$ ) inkubiert. Die Konzentration von  $300 \mu\text{M}$  Cisplatin wurde gewählt, da der Uptake bei dieser Zelllinie ca. 2,7-mal geringer war als bei der sensitiven Zelllinie A2780. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abb. 3.25 dargestellt.

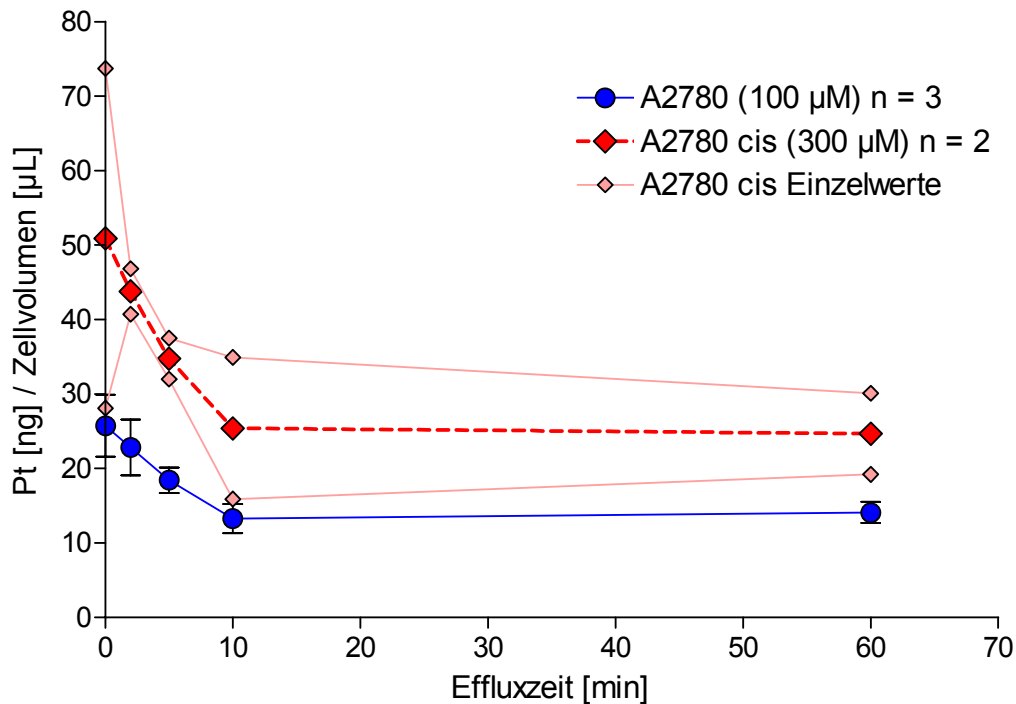


Abb. 3.25 Veränderung der intrazellulären Platinkonzentration nach Ende der Inkubation mit Cisplatin (A2780  $100 \mu\text{M}$ ,  $\text{MW} \pm \text{SD}$ ,  $n = 3$ ; A2780 cis  $300 \mu\text{M}$ , Mittelwert und Einzelwerte,  $n = 2$ )

Für die Zelllinie A2780 cis sind sowohl die Einzelwerte als auch eine Mittelwerts-Kurve dargestellt. Die Ergebnisse der einzelnen Messungen schwanken stark. Leider konnte bei diesem Versuch eine Annäherung der Anfangskonzentrationen nicht erreicht werden, jedoch ist erkennbar, dass die Kurve der resistenten Zellen bei höherer Ausgangskonzentration ( $300 \mu\text{M}$ ) deutlich anders verlief, als bei  $100 \mu\text{M}$ . Betrachtet man die Mittelwerts-kurve, so zeigte sich ein ähnlicher Verlauf, wie bei der sensitiven Zelllinie A2780. Nach einem anfänglichen linearen Abfall folgte eine flache Phase. Demnach fand in den ersten 10 Minuten eine rasche Abnahme der Platinkonzentration statt. Zwischen dem Zeitpunkt  $t = 10 \text{ min}$  und  $t = 60 \text{ min}$  fand in beiden Zelllinien keine Veränderung mehr statt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die ersten Minuten zur Beurteilung des Efflux in diesem Zelllinienpaar von besonderer Bedeutung sind.

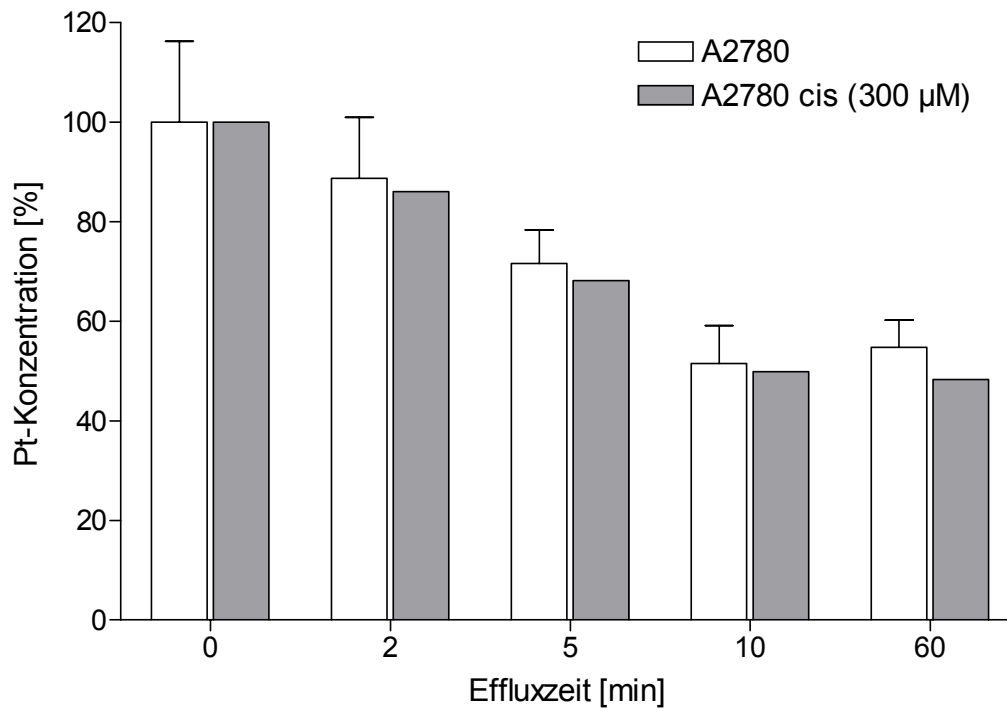


Abb. 3.26 *Prozentuale Veränderung der intrazellulären Platinkonzentration nach Ende der Inkubation mit Cisplatin (A2780 100 µM, MW ± SD, n = 3; A2780 cis 300 µM, Mittelwerte, n = 2)*

Zum besseren Vergleich der beiden Kurven sind die Ergebnisse in Abb. 3.26 prozentual dargestellt. Diese Darstellung zeigt, dass die intrazellulären Platinkonzentrationen in beiden Zelllinien vergleichbar schnell abnahmen. Die Effluxgeschwindigkeiten scheinen sich kaum zu unterscheiden.

### Zervixkarzinomzellen HeLa und HeLa CK

In Abb. 3.27 sind die Ergebnisse für die intrazellulären Platinkonzentrationen nach zweistündiger Cisplatininkubation und anschließender Inkubation mit frischem Medium für das Zelllinienpaar HeLa / HeLa CK dargestellt. In beiden Zelllinien fand kein Abfall der Konzentrationen statt. Selbst nach 120 min waren die Platinkonzentrationen noch auf dem Anfangsniveau. Trotz der unterschiedlichen Anfangskonzentration fanden in beiden Zelllinien kaum Veränderungen statt, wie die prozentuale Darstellung in Abb. 3.28 zeigt.

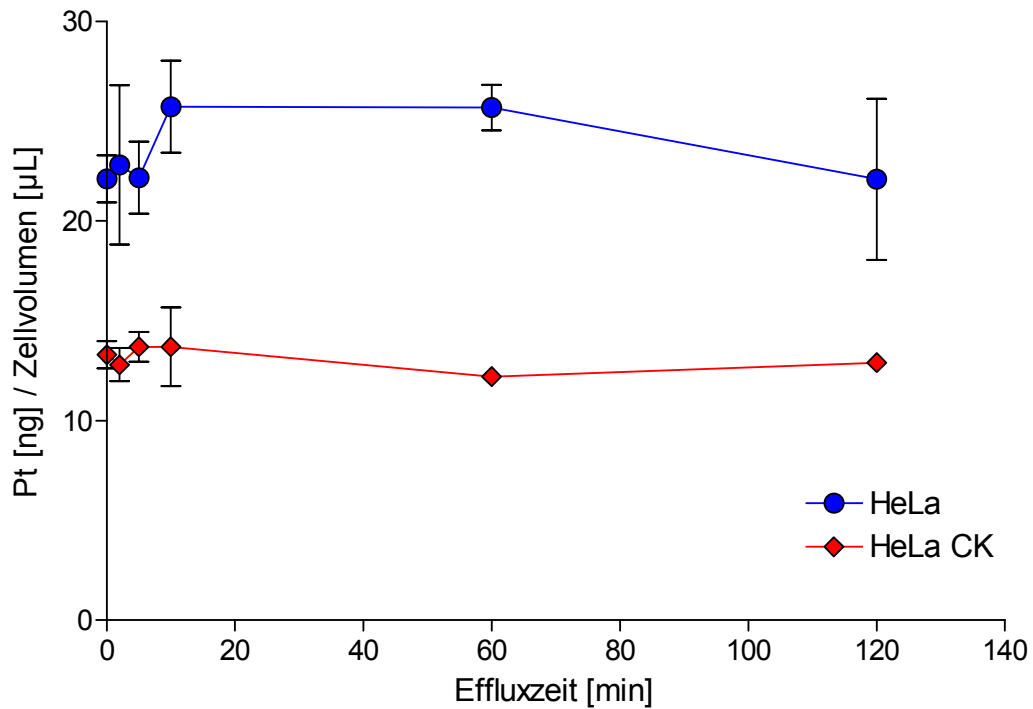


Abb. 3.27 Veränderung der intrazellulären Platinkonzentration nach Ende der Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin in HeLa- und HeLa CK-Zellen (MW  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). Die SD war teilweise so niedrig, dass sie in der Grafik durch das Symbol überdeckt wird.

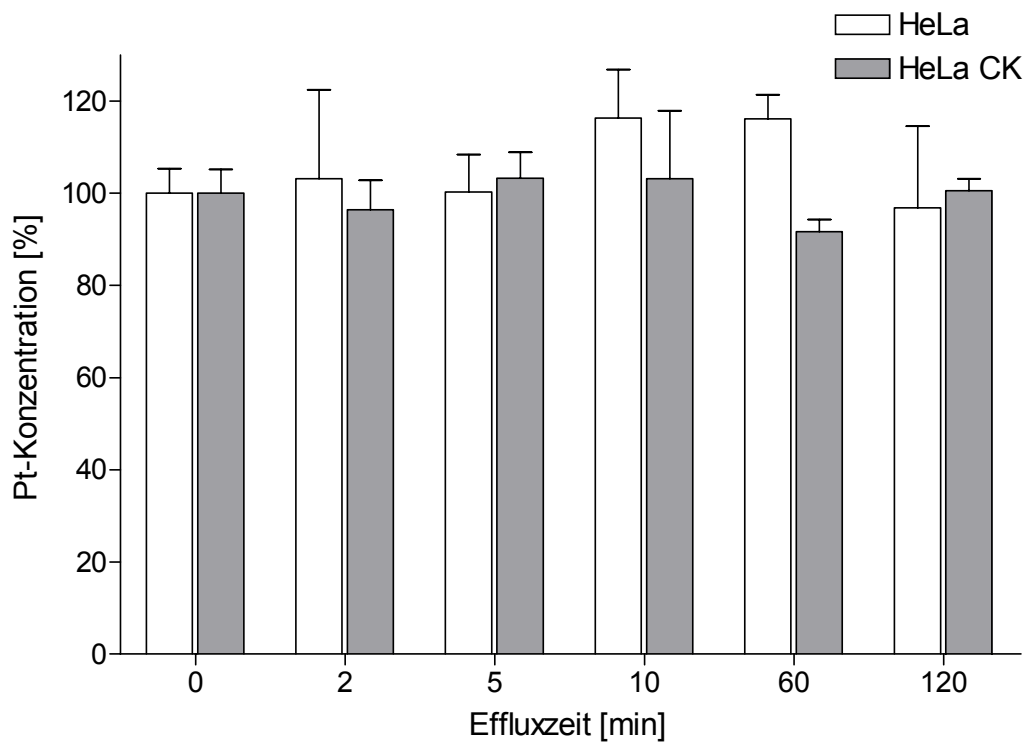


Abb. 3.28 Prozentuale Veränderung der intrazellulären Platinkonzentration nach Ende der Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin in HeLa- und HeLa CK-Zellen (MW  $\pm$  SD,  $n = 3$ )

In beiden untersuchten Zelllinienpaaren zeigten sich nach Ende der Inkubation mit Cisplatin kaum Unterschiede hinsichtlich der Abnahme der intrazellulären Platinkonzentration zwischen cisplatin-sensitiven und -resistenten Zellen, wenn die Ausgangskonzentration vergleichbar war.

### **3.5 Anwendungen der Quantifizierung von DNA-Platinierung und intrazellulärer Platinkonzentration**

#### **3.5.1 DNA-Platinierung und intrazelluläre Platinkonzentration in Hamster-Fibroblasten**

In Kooperation mit dem Institut für Toxikologie der Universität Mainz wurden die DNA-Platinierung in Hamster-Fibroblasten V79B und der daraus gewonnenen Zelllinie CL-V5B untersucht. Letztere Zelllinie wurde durch ihre Hypersensitivität zu Mitomycin C selektiert. Sie zeigt zudem Hypersensitivität gegenüber Cisplatin, jedoch kaum gegenüber UV-Schäden oder Alkylantien.

Die Arbeitsgruppe von Prof. Kaina versucht Gene zu finden, die für diese Hypersensitivität verantwortlich sind. Funktionelle Untersuchungen zum Ausmaß der DNA-Platinierung sollten zu diesem Ziel beitragen.

Die beiden Zelllinien wurden in Mainz mit verschiedenen Konzentrationen Cisplatin inkubiert und die DNA isoliert und quantifiziert. Die Platin-Analytik fand dann wie in Kap. 2.5 beschrieben statt. Die Einzelergebnisse sind in Anhang E dargestellt.

Die Untersuchungen zur DNA-Platinierung zeigten, dass die gegenüber Cisplatin hypersensitive Zelllinie CL-V5B weniger Addukte bildete als die parentale Zelllinie V79B (s. Abb. 3.29).

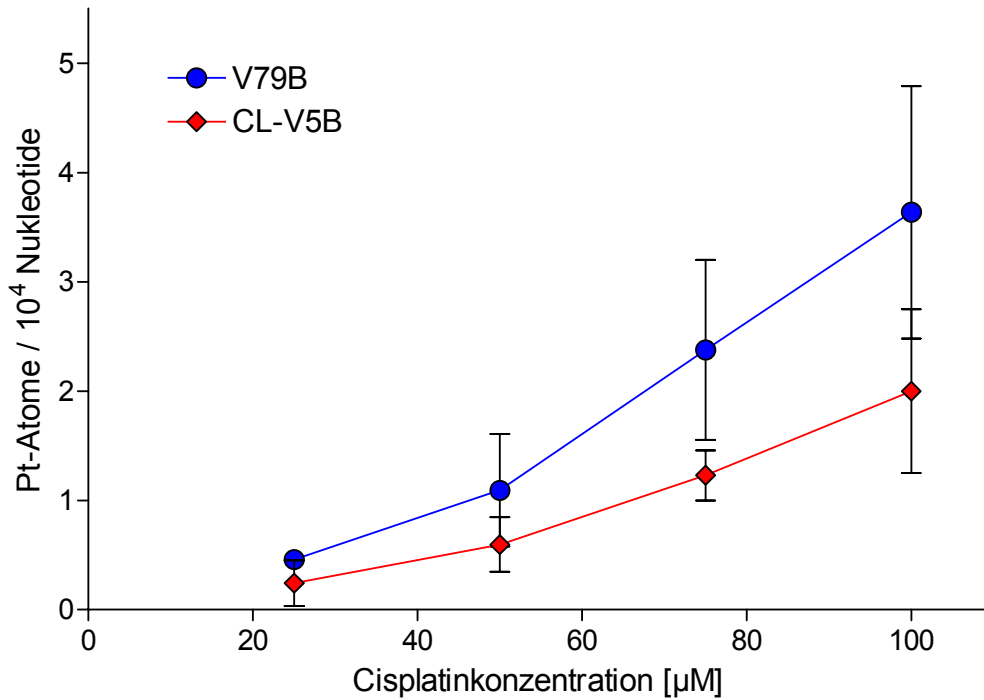


Abb. 3.29 DNA-Platinierung in der cisplatinsensitiven und -hypersensitiven Hamsterfibroblastenzelllinie (MW  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). Die SD war teilweise so niedrig, dass sie in der Grafik durch das Symbol überdeckt wird.

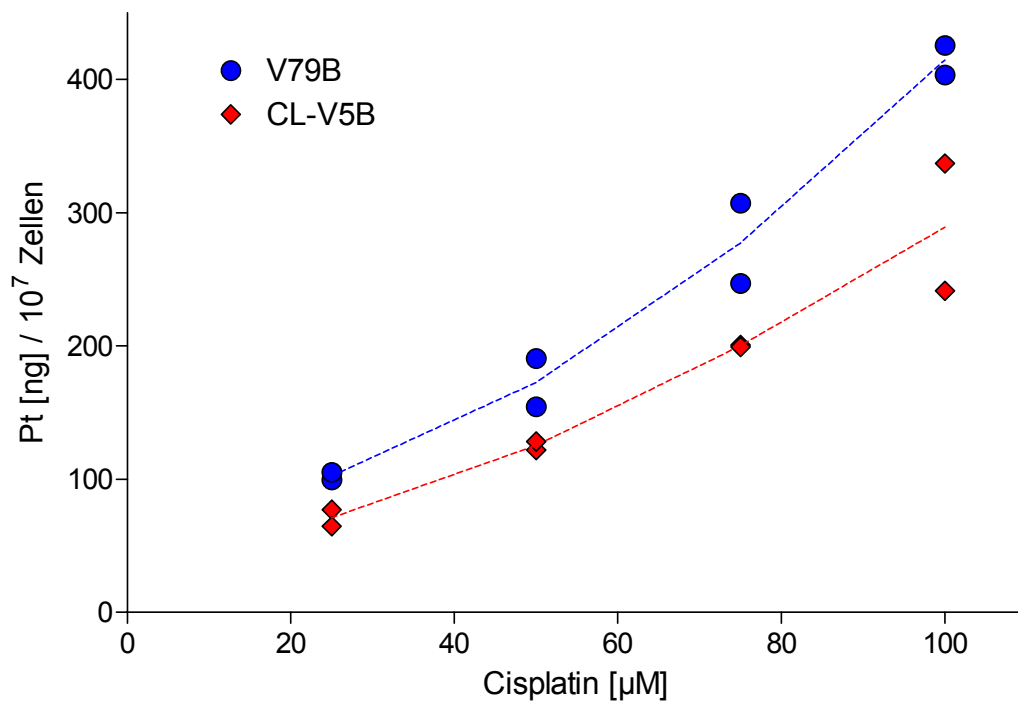


Abb. 3.30 Intrazelluläre Platinkonzentrationen in der cisplatinsensitiven und -hypersensitiven Hamsterfibroblastenzelllinie nach 2-stündiger Inkubation mit Cisplatin (gestrichelte Linie = MW,  $n = 2$ )

Diese Ergebnisse sind unerwartet, passen jedoch zu den in Abb. 3.30 dargestellten Unterschieden in der intrazellulären Platinkonzentration dieser Zelllinien nach Inkubation mit Cisplatin. Die hypersensitive Zelllinie CL-V5B akkumuliert weniger Platin in der Zelle als die parentale Zelllinie V79B.

Hier müssen nun weitere Untersuchungen klären, wie es zu diesen unerwarteten Unterschieden in der intrazellulären Platinkonzentration und Adduktbildung kommt und welche Faktoren oder evtl. Gene daran beteiligt sind.

### **3.5.2 Einfluss eines Raf-Kinase-Inhibitors auf die DNA-Platinierung und die intrazelluläre Platinkonzentration**

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. Strumberg (Westdeutsches Tumorzentrum des Universitätsklinikums Essen) wurde der Einfluss eines in der Klinischen Prüfung befindlichen Raf-Kinase-Inhibitors (im Folgenden als Testsubstanz bezeichnet) auf die DNA-Platinierung und die intrazelluläre Platinkonzentration untersucht. Dazu wurden Zellen der Lungenkarzinomzelllinie HCT8 vier Stunden mit Cisplatin in An- oder Abwesenheit der Testsubstanz inkubiert. Um den Einfluss der Testsubstanz näher zu charakterisieren, wurde in einem weiteren Versuch zuerst 4 Stunden mit Cisplatin inkubiert, das Medium gewechselt und weitere 4 Stunden mit der Testsubstanz inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz, bei dem nach der Cisplatin-Inkubation 4 Stunden nur mit Medium inkubiert wurde. Anschließend wurde jeweils die intrazelluläre Platinkonzentration und die DNA-Platinierung quantifiziert. Außer mit Cisplatin wurden diese Versuche auch mit Oxaliplatin durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte durch Frau M. Heim in Essen und die DNA- und Platin-Analytik erfolgte wie in Kap. 2.5 beschrieben.

Die Ergebnisse für die Untersuchung der DNA-Platinierung (vgl. Anhang E) sind in Abb. 3.31 dargestellt.

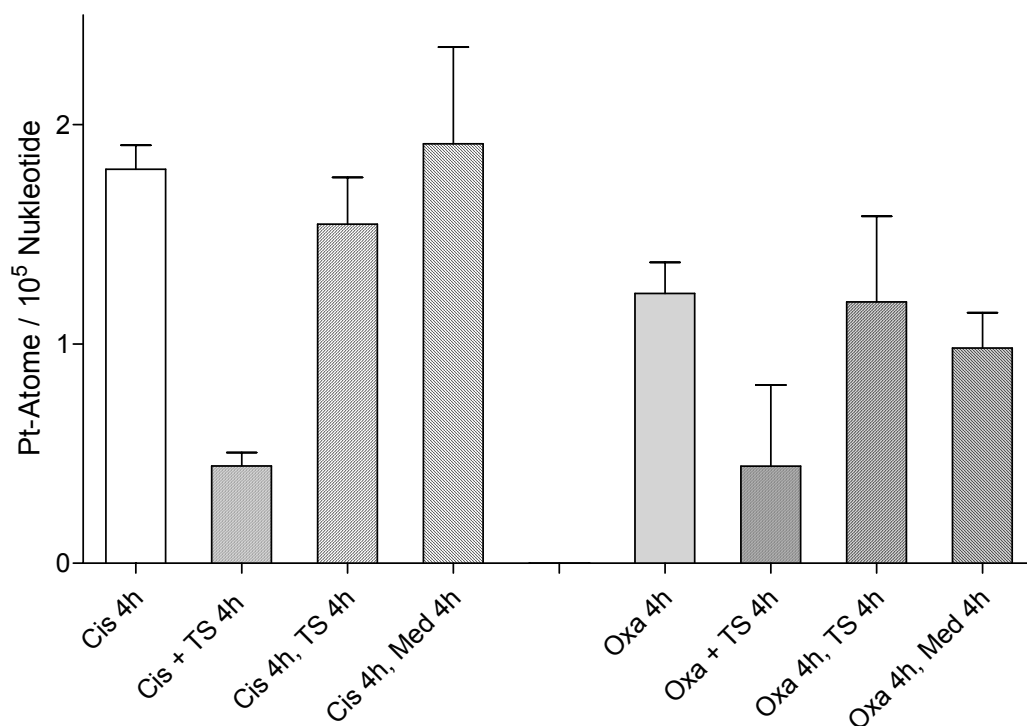


Abb. 3.31 DNA-Platinierung in Lungenkarzinomzelllinie HCT8 nach Inkubation mit Cisplatin (Cis) bzw. Oxaliplatin (Oxa) mit und ohne Testsubstanz (TS) bzw. mit reinem Nährmedium (Med) ( $MW \pm SD$ ,  $n = 3$ )

Es zeigte sich, dass eine Koinkubation mit der Testsubstanz zu einer deutlichen Verringerung der DNA-Platinierung führte. Um herauszufinden, ob dieser Effekt auf Interaktionen vor der Adduktbildung zurückzuführen ist oder ob die Testsubstanz die gebildeten Addukte direkt beeinflusst, wurde in einem weiteren Versuch die Testsubstanz erst nach Inkubation mit Cisplatin bzw. Oxaliplatin in frischem, zytostatikafreien Medium zu den Zellen gegeben. Als Kontrollversuch wurde dieser Versuch auch ohne Testsubstanz durchgeführt. Die Ergebnisse in Abb. 3.31 zeigen, dass bei diesem Versuch das Ausmaß der Adduktbildung vergleichbar ist mit der Adduktbildung ohne Testsubstanz. Zusätzlich wurde auch die intrazelluläre Platinkonzentration nach Inkubation mit Cisplatin bzw. Oxaliplatin mit und ohne Testsubstanz untersucht.

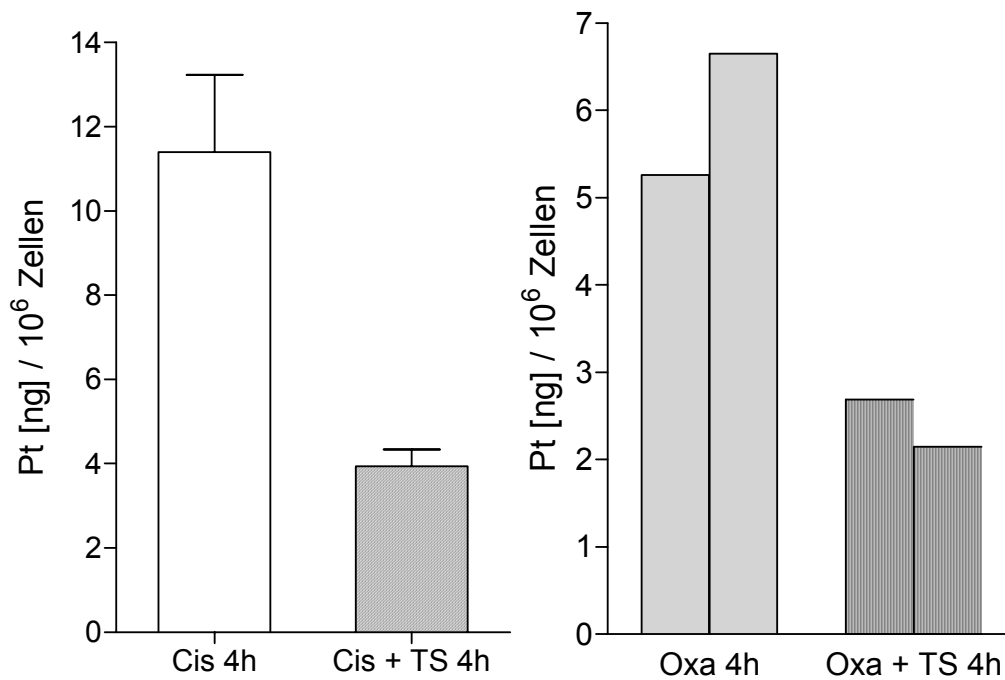


Abb. 3.32 Intrazelluläre Platinkonzentration nach Inkubation mit Cisplatin (Cis) bzw. Oxaliplatin (Oxa) mit und ohne Testsubstanz (TS) (bei Cisplatin:  $MW \pm SD$ ,  $n = 3$ )

Die Ergebnisse in Abb. 3.32 zeigen, dass die intrazelluläre Platinkonzentration durch Koinkubation mit der Testsubstanz verringert wird. Die beobachteten Effekte treten sowohl bei Cisplatin als auch bei Oxaliplatin auf.

Eine Koinkubation von Cisplatin oder Oxaliplatin mit der Testsubstanz führt sowohl zu einer verringerten Akkumulation als auch zu einer verringerten Adduktbildung.



## 3.6 Quantifizierung der intrazellulären Glutathionkonzentration

### 3.6.1 Validierung

#### Selektivität

Durch die für Glutathion sehr spezifische Derivatisierungsreaktion (vgl. Abb. 2.6) entstand nur ein fluoreszierendes Produkt, sodass nur ein Peak im resultierenden Elektropherogramm sichtbar war. Abb. 3.33 zeigt beispielhaft zwei Elektropherogramme für die Bestimmung der intrazellulären Glutathionkonzentration in dem Zelllinienpaar A2780 / A2780 cis.

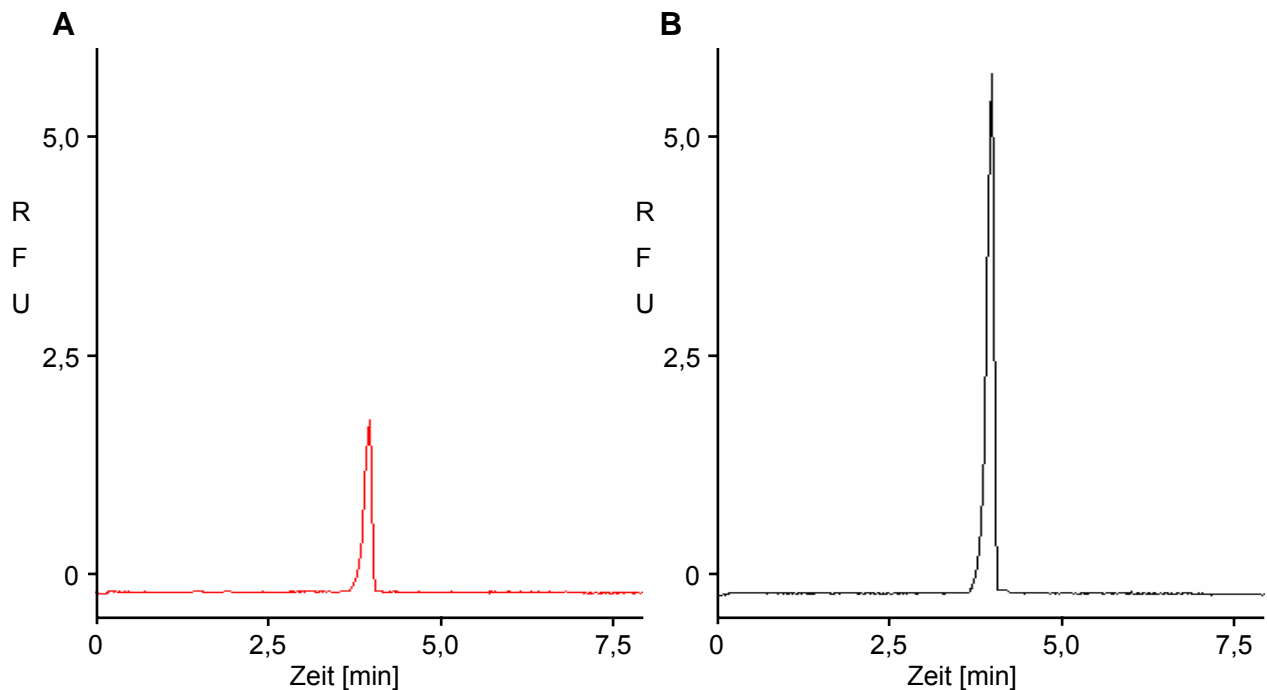


Abb. 3.33 Elektropherogramme der Messung von intrazellulärem Glutathion in Ovariakarzinomzellen A2780 (A) und A2780 cis (B) (jeweils in  $10^6$  Zellen; RFU = relative Fluoreszenz-Einheiten)

#### Messbereich und Bestimmungsgrenze

Als Messbereich wurden Konzentrationen zwischen 3 und 100  $\mu\text{M}$  gewählt. Die in den Tumorzellen gemessenen Konzentrationen lagen in dem gewählten Messbereich. Die Daten für die Präzision und Richtigkeit bei der Bestimmungsgrenze von 3  $\mu\text{M}$  (vgl. Anhang F) sind in Tab. 3.10 dargestellt.

Tab. 3.10 *Richtigkeit (RE [%]) und Präzision (RSD [%]) für die Bestimmungsgrenze der CE-Methode zur Bestimmung von intrazellulärem Glutathion (n = 5)*

<b>Bestimmungsgrenze Glutathion [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	3,0
RSD [%]	12,7
RE [%]	-2,1

### Linearität

Insgesamt wurden sechs Kalibriergeraden (Arbeitsbereich 3-100  $\mu\text{M}$ , sechs Standards) ausgewertet. Die beste Anpassung wurde durch eine lineare Regression (Wichtung 1/x) gefunden. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.11 zusammengefasst.

Tab. 3.11 *Korrelationskoeffizienten und Residuen von sechs Kalibriergeraden der CE-Methode zur Bestimmung von intrazellulärem Glutathion*

<b>Konzentrationsbereich Glutathion [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	<b>Korrelationskoeffizient <math>r</math> (n = 6)</b>	<b>Residuen (n = 36)</b>	
		Spannweite [%]	Mittelwert [%]
3 - 100	0,99895 - 0,99993	0,16 - 20,4*	3,85

\*Wert trat an Bestimmungsgrenze auf

### Wiederfindung

Die Wiederfindung wurde anhand eines Zelllysates, das mit drei verschiedenen Konzentrationen Glutathion versetzt wurde, bestimmt. Die prozentuale Wiederfindung (W) wurde nach Gl. 2.5 berechnet und die Ergebnisse in Tab. 3.12 dargestellt.

Tab. 3.12 *Mittlere Wiederfindung von Glutathion im Zelllysate (n = 3)*

<b>Konzentration Glutathion [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	<b>Wiederfindung [%]</b>
5	97,0
40	103,1
80	100,3

Die mittlere Wiederfindungsrate (n = 3) bezüglich der drei untersuchten Glutathionkonzentrationen lag zwischen 97,0 und 103,1 % (vgl. Anhang F), die Abweichung von 100 % betrug somit nicht mehr als 3,1 %.

### Richtigkeit und Präzision

Die Prüfung auf Richtigkeit erfolgte an fünf Tagen für jeweils drei verschiedene Konzentrationen von Glutathion. Tab. 3.13 ist zu entnehmen, dass die Richtigkeit der CE-Methode den gestellten Anforderungen genügte, wonach die prozentuale Abweichung zwischen der berechneten Konzentration und der Nominalkonzentration maximal 15 % betragen darf.

Tab. 3.13 *Richtigkeit (RE [%]) der CE-Methode zur Bestimmung von intrazellulärem Glutathion (n = 6)*

Konzentration Glutathion [ $\mu\text{M}$ ]	RE [%]
5	-0,8
50	2,2
90	1,4

Die Within- und Between-day-Präzision wurde durch fünfmalige Bestimmung von drei Glutathionkonzentrationen ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.14 dargestellt.

Tab. 3.14 *Within- und Between-day-Präzision (RSD [%]) der CE-Methode zur Bestimmung von intrazellulärem Glutathion (n = 6)*

Konzentration Glutathion [ $\mu\text{M}$ ]	RSD [%]	
	Within-day	Between-day
5	2,4	4,0
50	3,7	4,0
90	3,0	3,5

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass Glutathion mit hoher Präzision bestimmt werden konnte. Die ermittelten Standardabweichungen waren  $\leq 4$  %. Die Between-day-Präzision gilt als Kriterium für die Reproduzierbarkeit der Methode über einen längeren Zeitraum. Erwartungsgemäß war die Streuung der Messergebnisse im Rahmen der Between-day-Präzision etwas größer.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Methode hinsichtlich der Präzision und der Richtigkeit die Akzeptanzkriterien der FDA, wonach Variationskoeffizient und relativer Fehler nicht größer als 15 % sein dürfen, erfüllte (vgl. Anhang F).

## Stabilitätsuntersuchungen

### *Stabilität der Glutathion-Stammlösung und der NDA-Lösung bei -20 °C*

Initial wurde die Einfrier-Auftau-Stabilität von Glutathion in der Stammlösung (Lösungsmittel: Salzsäure / EDTA) untersucht. Diese Untersuchung erfolgte, um den Einfluss extremer Temperaturschwankungen von -24 °C (Tiefkühlfach) bis 25 °C (Raumtemperatur) zu überprüfen. Die Stabilität wurde nach einem, zwei bzw. drei Einfrier-Auftau-Zyklen nach Gl. 2.7 berechnet. Als Referenz diente jeweils eine frisch hergestellte Lösung, die Glutathion in der gleichen Konzentration enthielt.

*Tab. 3.15 Stabilität der Glutathion-Stammlösung (Lagerung bei -24 °C)*

<b>Zyklus</b>	<b>Einfrier-Auftau-Stabilität [%]</b>
1	99,0
2	98,2
3	104,9
<b>Lagerungsdauer [Tage]</b>	<b>Langzeitstabilität [%]</b>
44	104,7

Die Ergebnisse der Tab. 3.15 zeigen, dass sowohl wiederholte Einfrier-Auftau-Zyklen als auch eine Zeitspanne von mehr als einem Monat keinen relevanten Einfluss auf die Konzentration von Glutathion in der Stammlösung hatten. Die Einzelmessungen sind in Anhang F dargestellt.

Die Untersuchung der Langzeitstabilität bei -24 °C wurde auch für die NDA-Lösung (Lösungsmittel: DMSO) durchgeführt. Tab. 3.16 zeigt, dass die Lagerung der NDA-Lösung über einen Zeitraum von einem Monat keinen relevanten Einfluss auf die Stabilität der Lösung hatte.

*Tab. 3.16 Stabilität der NDA-Lösung (Lagerung bei -24 °C)*

<b>Lagerungsdauer [Tage]</b>	<b>Stabilität [%]</b>
31	98,9

Die Ergebnisse zur Untersuchung der Stabilität von Glutathion-Stammlösung und NDA-Lösung zeigen, dass diese Lösungen frühestens nach einem Monat Lagerung frisch hergestellt werden müssen.

#### *Stabilität der Glutathion-Arbeitslösungen*

Die Glutathion-Arbeitslösungen GSH-AL1 und GSH-AL2 wurden täglich neu aus der Glutathion-Stammlösung hergestellt. Die Stabilität von Glutathion in den Arbeitslösungen (Konzentration GSH-AL1: 0,1 mM, GSH-AL2: 0,01 mM, Lösungsmittel: Perchlorsäure / Acetonitril), die bei Raumtemperatur aufbewahrt wurden, wurde bis zu 5 Stunden (300 min) untersucht. Tab. 3.17 legt dar, dass die Stabilität von Glutathion bis zu 5 Stunden gewährleistet ist (vgl. Anhang F).

*Tab. 3.17 Stabilität der Glutathion-Arbeitslösungen bei Raumtemperatur*

Zeit [min]	Stabilität [%]	
	GSH-AL1	GSH-AL2
15	106,8	90,4
30	95,0	105,5
45	98,1	104,5
60	96,1	102,8
90	99,5	104,3
150	101,7	93,4
210	95,5	96,3
300	100,3	93,4

#### *Stabilität des Derivatisierungsproduktes im Autosampler*

Wie unter Kap. 2.6.2 beschrieben, wurde jede Glutathion-Probe vor der Injektion derivatisiert. Daher wurde die Stabilität des Derivatisierungsprodukts in der Messprobe, aufbewahrt bei Raumtemperatur im Autosampler des CE-Systems, über einen Zeitraum von 2 Stunden untersucht (s. Abb. 3.34).

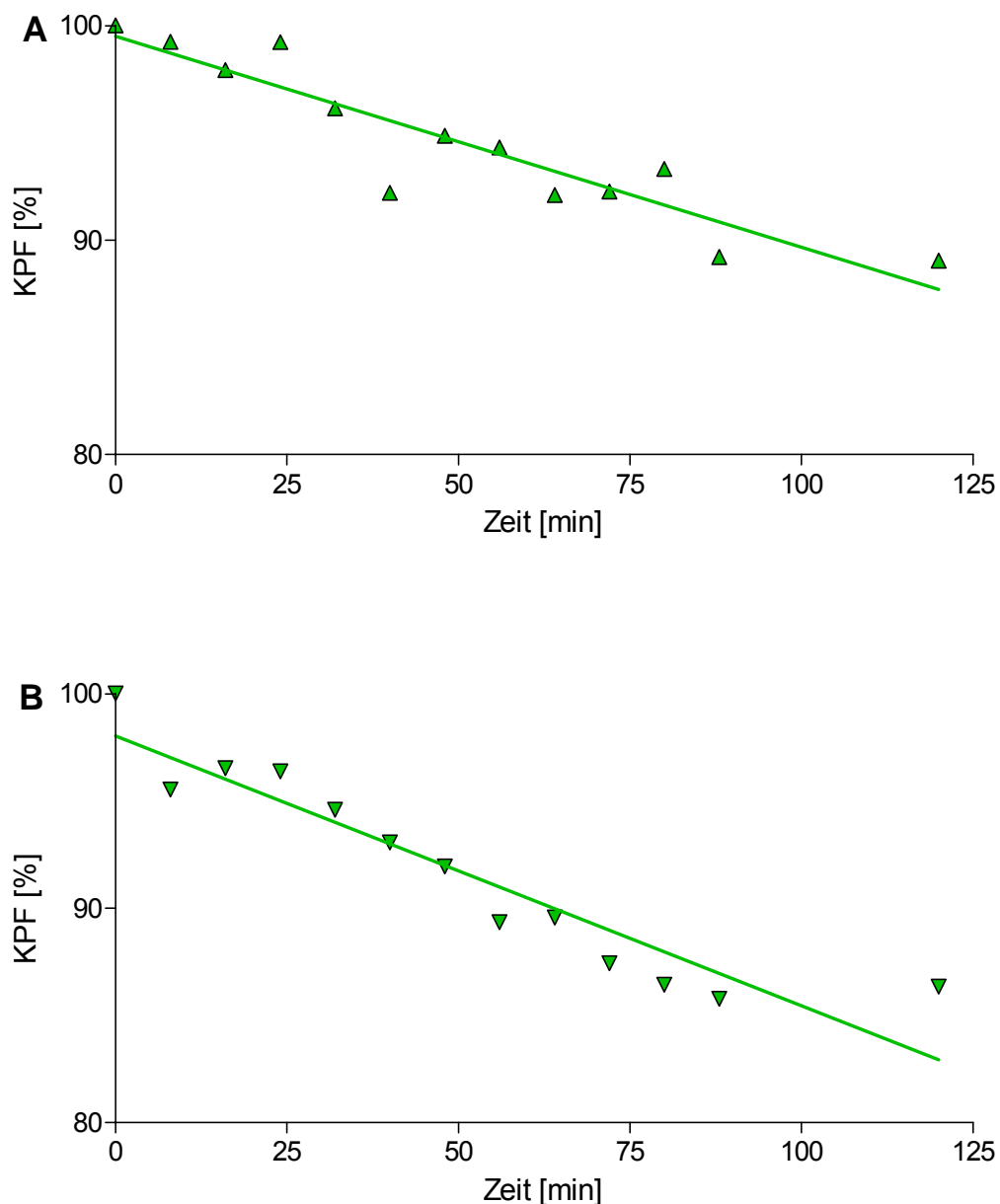


Abb. 3.34 *Stabilität des Derivatisierungsproduktes bei Raumtemperatur nach Derivatisierung der Glutathion-Arbeitslösungen GSH-AL1 (A) und GSH-AL2 (B) (KPF = Korrigierte Peakfläche)*

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Stabilität des Derivatisierungsproduktes über den untersuchten Zeitraum nicht gewährleistet war. Es kam zu einer linearen Abnahme und nach zwei Stunden bei GSH-AL1 bzw. einer Stunde bei GSH-AL2 fiel die bestimmbar Menge auf unter 90 % des Anfangswertes (vgl. Anhang F).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde jede Probe einzeln derivatisiert und direkt danach vermessen. Eine gleichzeitige Herstellung mehrerer Proben und eine Beladung des Autosamplers waren nicht möglich.

### 3.6.2 Intrazelluläre Glutathionkonzentrationen in Tumorzellen

Mit Hilfe der Kapillarzonen-Elektrophorese (CZE) und der sehr spezifischen Derivatisierung war es möglich, intrazelluläres Glutathion in den Tumorzellen selektiv mit einer validierten Methode zu bestimmen.

Die Bestimmung der intrazellulären Glutathionkonzentration erfolgte im Zelllinienpaar A2780 / A2780 cis.

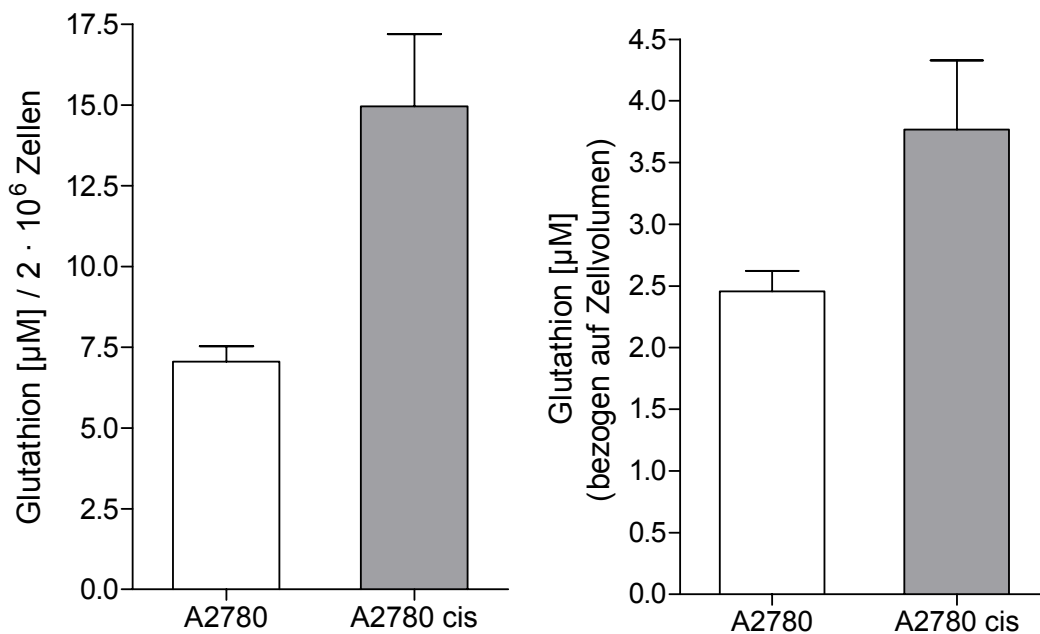


Abb. 3.35 Glutathionkonzentration in A2780- und A2780 cis-Zellen (MW ± SD, n = 6)

Die Ergebnisse in dem Zelllinienpaar A2780 / A2780 cis sind in Abb. 3.35 bezogen auf die Zellzahl und das Zellvolumen dargestellt. Die Ergebnisse der Einzelmessungen sind in Anhang F dargestellt. Die intrazelluläre Glutathionkonzentration in den resistenten Zellen A2780 cis war signifikant höher als in den sensitiven Zellen A2780 ( $p < 0,01$ ).

### 3.7 Vergleich der untersuchten Parameter

In dieser Arbeit wurden an unterschiedlichen Zelllinienpaaren humaner Tumorzellen verschiedene Parameter untersucht, die Einfluss auf die Platinsensitivität haben können.

Tab. 3.18 zeigt eine Zusammenstellung aller untersuchten Parameter. Es sind die beobachteten Unterschiede zwischen cisplatinsensitiven und -resistenten Zellen der verschiedenen Zelllinienpaare dargestellt.

Tab. 3.18 Zusammenstellung der untersuchten Parameter

Zelllinie	2102 / 2102 Klon B	A2780 / A2780 cis			HeLa / HeLa CK
		I	II	III	
Resistenzgrad	1,9	5,4	4,3	2,0	3,6
Adduktverhältnis	1,7	5,4	3,3	1,8	1,9
DNA-Reparatur	n.b.	n.b.	Kaum Unterschiede	n.b.	Kaum Unterschiede
Uptake	n.b.	n.b.	2,7	n.b.	2,9
Efflux	n.b.	n.b.	Kaum Unterschiede	n.b.	Kaum Unterschiede
Glutathion	n.b.	n.b.	1,5	n.b.	n.b.

Der Resistenzgrad beschreibt das Verhältnis der Zytotoxizität zwischen resistenter Zelllinie und sensitiver, parentaler Zelllinie. Beim Adduktverhältnis wurden in allen untersuchten Zelllinienpaaren Unterschiede zwischen cisplatinsensitiver und -resistenter Zelllinie beobachtet. Bei der DNA-Reparatur und bei dem Efflux traten in den untersuchten Zelllinien kaum Unterschiede auf. Deutliche Veränderungen zwischen sensitiven und resistenten Zellen waren hingegen bei dem Uptake und der intrazellulären Glutathionkonzentration zu beobachten.



## 4 Diskussion

Im Folgenden werden die in Kap. 3 beschriebenen Ergebnisse diskutiert. Es wird herausgestellt, welchen Einfluss die untersuchten Parameter auf die Platin-DNA-Adduktbildung bei den verwendeten Zelllinien haben und welche Rolle sie bei der Charakterisierung der Platinsensitivität und der Untersuchung von Resistenzmechanismen spielen.

### 4.1 Charakterisierung von Tumorzelllinien

Bei der Untersuchung von Tumorzelllinien ist deren Charakterisierung von großer Bedeutung. Insbesondere die Unterschiede, die zwischen cisplatinempfindlicher und -resistenter Zelllinie existieren, stellen die Grundlage für weitere Untersuchungen dar.

In der vorliegenden Arbeit wurden Zellgröße und Zellvolumen der verwendeten Zelllinien bestimmt. Die deutlichen Unterschiede weisen darauf hin, dass die resistenten Zellen sich auch morphologisch verändert haben. Bei allen drei Zelllinienpaaren besaßen die cisplatinresistenten Zellen einen größeren Durchmesser und ein größeres Zellvolumen. Diese Ergebnisse erklären sich durch die Tatsache, dass diese Zellen durch die Cisplatingaben langsamer wuchsen und sich teilten und dadurch größer wurden.

Bei der Bestimmung der intrazellulären Konzentration eines Analyten wie Platin oder Glutathion benötigt man eine Bezugsgröße. Häufig wird in der Literatur eine Proteinbestimmung durchgeführt. Eine andere Möglichkeit ist jedoch, das Zellvolumen dafür heranzuziehen. Diese Methode ist in der Literatur z.B. bei Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Glutathionkonzentrationen und Cisplatinempfindlichkeit beschrieben<sup>43,105,106</sup>. Mit Hilfe des eingesetzten Casy<sup>®</sup>-Zellzählgerätes ließ sich die Bestimmung der Zellgröße und des Zellvolumens schnell und einfach durchführen. Daher wurde auf die aufwändigere Proteinbestimmung verzichtet. Das Zellvolumen diente somit als wichtige Bezugsgröße für die intrazelluläre Platin- und Glutathionkonzentration. Auf diese Weise konnten größen- und volumenbedingte Unterschiede herausgerechnet werden.

Ein weiteres wichtiges Charakteristikum der Zelllinien ist die  $EC_{50}$ , d.h. die Cisplatinkonzentration, bei der in der Hälfte der Zellen eine Wirkung – in diesem speziellen Fall den Zelltod – ausgelöst wird. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die  $EC_{50}$  zu bestimmen. Die geschieht meist durch Zytotoxizitätstests. Da die verwendeten Methoden auf unterschiedlichen Prinzipien beruhen, liefert jeder Zytotoxizitätstest andere Ergebnisse. Man unterscheidet zwischen Klonogenitätsassays und Proliferationsassays. Bei Klonogenitätsassays gelten die Zellen als noch lebend, die in der Lage sind, Kolonien auszubilden. Nachteil dieser Methode ist, dass viel Zeit benötigt wird, bis sich zählbare Kolonien ausgebildet haben. Außerdem ist der Zählvorgang schlecht zu automatisieren. Zu den am häufigsten benutzten Proliferationsassays gehören der Sulforhodamin B-Assay (SRB-Assay), der auf einer Proteinbestimmung basiert, und der MTT-Assay, der die mitochondriale Aktivität der Zellen bestimmt. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass die Zellzahl unter der nicht immer zutreffenden Voraussetzung abgeschätzt wird, dass die mitochondriale Aktivität pro Zelle konstant ist bzw. bleibt. Vorteile des MTT-Assays sind, dass die Methode komfortabel, gut reproduzierbar und leicht in Multiwell-Platten durchzuführen ist und dass der entstandene Farbstoff im Microplate-Reader quantifiziert werden kann. In dieser Arbeit konnte auf einen von *Mueller et al.* entwickelten, homogenen MTT-Assay zurückgegriffen werden, bei dem alle Reaktionen im Well ablaufen und keine Waschschriffe notwendig sind<sup>107</sup>

Die Ergebnisse in Kap. 3.1.2 zeigen, dass die Unterschiede der  $EC_{50}$  bei den Hodenkarzinomzellen eher gering waren. Zur Etablierung der resistenten Klone wurde die parentale Zelllinie zehnmal einer zweistündigen Cisplatinexposition ausgesetzt (anfangs 30  $\mu\text{M}$ , später 20  $\mu\text{M}$ ). Diese Behandlungsmethode hat nicht zu einer ausgeprägten erworbenen Cisplatinresistenz geführt. Lediglich Klon B hat einen Resistenzgrad von knapp 2. Für vergleichende Untersuchungen ist es jedoch wünschenswert, wenn die Unterschiede zwischen sensitiven und resistenten Zellen möglichst groß sind. Für einen höheren Resistenzgrad wären längere und häufigere Cisplatinexpositionen notwendig.

Selbst wenn das verwendete Testverfahren sehr reproduzierbare Ergebnisse liefert, können die Schwankungen in der ermittelten  $EC_{50}$  groß sein. Diese Schwankungen sind dann auf die Tumorzellen zurückzuführen, da diese sich verändern, wenn man sie in Kultur hält. Schon nach wenigen Passagen können Zelllinien ihre Eigenschaften ändern und somit eine veränderte  $EC_{50}$  zeigen. Besonders bei resistenzgezüchteten Zellen ist es möglich, dass sie die erworbene Resistenz bei längerer Kultivierung wieder verlieren.

Dies zeigte sich auch bei den in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien A2780 und A2780 cis. Der anfängliche Resistenzgrad von 5,4 war nach längerer Kultivierung auf 2 zurückgegangen. Daher war es notwendig, die Zellen regelmäßig mit einer geringen Konzentration Cisplatin zu versetzen, damit sie ihre Resistenz behalten. Jedoch können bei jedem neuen Kontakt mit Cisplatin neue Mutationen auftreten oder Resistenzmechanismen aktiviert werden. Daher ist es ratsam, für geplante Versuche mit Zelllinien eine ausreichende Zahl an Backups anzufertigen, auf die während des Versuchszeitraums zurückgegriffen werden kann. So hat man immer Zellen mit demselben Resistenzmuster zur Verfügung, was die Aussagekraft der Ergebnisse erhöht.

Die mit Hilfe von Zelllinien gewonnenen Erkenntnisse können z.B. der Untersuchung von Resistenzmechanismen dienen, sind jedoch nur eingeschränkt auf die *In-vivo*-Situation übertragbar. Die Verhältnisse in einem Tumor sind kaum nachahmbar und je nach Lokalisation verschieden. Es wäre also wünschenswert, Tumorzellen von Patienten auf bestimmte Parameter untersuchen zu können, um bessere Aussagen über die *In-vivo*-Situation zu machen. In weiteren Untersuchungen sollte versucht werden, Tumorzellen von individuellen Patienten zu isolieren und – jedenfalls vorübergehend – zu kultivieren und bezüglich ihrer Platinsensitivität zu charakterisieren. Einen Fortschritt in diese Richtung machen z.B. multiparametrische, biohybride Sensorchips. In diesem Testsystem werden Tumorzellen direkt auf einen Sensorchip aufgetragen, der verschiedenste Veränderungen messen kann<sup>108</sup>.

## 4.2 DNA-Platinierung

Die Versuchsbedingungen zur Adduktbildung in Tumorzellen wurden durch Vergleich der Versuchsbedingungen in der Literatur (vgl. Tab. 2.2) und einigen Vorversuchen ermittelt. Insbesondere die Inkubationszeit und Inkubationskonzentration sowie die Waschschriffe wurden so optimiert. Die Untersuchung der Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Adduktbildung zeigte, dass eine Inkubationsdauer von 4 Stunden und Cisplatinkonzentrationen zwischen 25 und 100  $\mu\text{M}$  bei einer moderaten Zellzahl Platin-Nukleotid-Verhältnisse lieferte, die problemlos bestimmbar waren.

Das in dieser Arbeit angewandte Verfahren zur Quantifizierung der DNA-Platinierung basiert auf der Methode von *Kloft et al.*<sup>97</sup>. Dieses gliedert sich in die Abschnitte Leukozytenisolierung, Extraktion der DNA aus den Leukozyten, DNA-Quantifizierung

und Quantifizierung des an der DNA gebundenen Platins, die nach *Kloft et al.* mittels GF-AAS durchgeführt wurde. *A.C. Pieck* hat diese Methode optimiert<sup>98</sup>, und im Rahmen dieser Arbeit wurde das Verfahren von Leukozyten auf Tumorzellen übertragen. *Pieck* konnte zeigen, dass das DNA-Isolierungsverfahren mit dem QIAamp<sup>®</sup> DNA-Blood-Kit für die nachfolgende Bestimmung der Platin-DNA-Addukte geeignet ist und hat sowohl die UV-spektrometrische Quantifizierung der DNA als auch die Bestimmung des an die DNA gebundenen Platins mit AAS validiert. Bis auf die Zellart (Tumorzellen statt Leukozyten) war die verwendete Methode identisch.

Parallel zu den Versuchen von *Pieck* wurde auch in dieser Arbeit der Einfluss von RNase auf die DNA-Quantifizierung und auf die Höhe der Platin-Nukleotid-Verhältnisse charakterisiert. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von *Pieck* waren die erhaltene DNA-Menge sowie das Platin-Nukleotid-Verhältnis nach Zusatz von RNase signifikant geringer. Ohne den Einsatz von RNase wären die Ergebnisse durch RNA-Addukte verfälscht. Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, da bekannt ist, dass Tumorzellen im Gegensatz zu Leukozyten vermehrt RNA synthetisieren. Daher wurde in dieser Arbeit stets RNase bei der Probenaufarbeitung eingesetzt. Damit wurde gewährleistet, dass das Platin-Nukleotid-Verhältnis ein Maß für die reine DNA-Adduktbildung ist. Mit der hier vorgestellten Methode wurde somit die Voraussetzung geschaffen, die DNA-Platinierung in Tumorzellen zuverlässig zu quantifizieren.

In dieser Arbeit wurde die DNA-Platinierung in drei verschiedenen cisplatinempfindlichen und -resistenten Zelllinienpaaren untersucht und verglichen. Die Ergebnisse zeigen, dass bei allen Paaren die cisplatinresistente Zelllinie deutlich weniger Addukte bildet, als die parentale, cisplatinempfindliche Zelllinie. Dies traf bei allen untersuchten Konzentrationen zu. Da die Zunahme der Adduktbildung bei steigender Cisplatinkonzentration in allen Fällen nahezu linear verlief, ließ sich ein mittleres Adduktverhältnis zwischen empfindlicher und resistenter Zelllinie ausrechnen. Der Vergleich dieses mittleren Adduktverhältnisses mit dem Resistenzgrad (siehe Tab. 3.7) machte deutlich, dass die Unterschiede in der Adduktbildung mit dem jeweiligen Resistenzgrad korrelieren. Besonders die Tatsache, dass ein Rückgang des Resistenzgrades bei A2780 / A2780 cis mit einem Rückgang der Adduktbildung in gleicher Größenordnung einherging, unterstreicht die zentrale Stellung der Adduktbildung bei der Charakterisierung der Platinsensitivität in Tumorzellen.

Bei dem Zelllinienpaar HeLa / HeLa CK war die Korrelation schwächer und zwar derart, dass der Grad der Resistenz höher war, als es die Unterschiede in der DNA-Platinierung vermuten ließen. Der Resistenzgrad ließ sich also nicht alleine durch die veränderte Adduktbildung erklären. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass es neben der Adduktbildung noch andere Faktoren gibt, die Einfluss auf die Zytotoxizität von Cisplatin haben und die für die Charakterisierung der Platinsensitivität von Bedeutung sind. Daher ist die Untersuchung dieser Faktoren Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

Die Quantifizierung der DNA-Platinierung in Tumorzellen ist zahlreich in der Literatur beschrieben (s. Tab. 2.2). Die Ergebnisse in den in Tab. 2.2 aufgelisteten Arbeiten entsprechen fast alle den in dieser Arbeit gezeigten Resultaten. Bis auf eine Ausnahme bei *De Pooter et al.*<sup>87</sup> konnte bei allen Arbeiten gezeigt werden, dass die DNA-Platinierung in cisplatinresistenten Zellen reduziert ist.

Ein Nachteil der hier dargestellten Methode ist, dass lediglich die Gesamtmenge an Platin, die an die DNA gebunden hat, bestimmt werden kann. Es ist keine Differenzierung zwischen den einzelnen Addukten möglich. Auch wenn man annimmt, dass nur ein kleiner Teil der gebildeten Addukte maßgeblich für die zytotoxische Wirkung von Cisplatin verantwortlich ist, können vergleichende Untersuchungen bezüglich der Gesamt-DNA-Platinierung wichtige Hinweise auf Unterschiede in sensiblen und resistenten Zellen liefern. Dennoch wäre es für weitergehende Untersuchungen wünschenswert, die gebildeten Addukte zu unterscheiden, um einen genaueren Einblick in die Rolle der einzelnen Addukte zu erhalten. Weiterhin wäre es auch von Interesse, die Platinierung der unterschiedlichen Nukleinsäuren (DNA, RNA, rDNA, rRNA) zu quantifizieren und zu vergleichen, da sich gezeigt hat, dass die Platinierung von rDNA und damit die Hemmung der rRNA-Synthese möglicherweise zum zytotoxischen Effekt von Cisplatin beiträgt<sup>24</sup>.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden ausschließlich mit Tumorzelllinien *in vitro* durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode könnte jedoch auch die DNA-Platinierung in Tumorzellen individueller Patienten untersucht werden. Dies wäre entweder durch Entnahme von Tumorgewebe nach einer platinhaltigen Chemotherapie oder durch Entnahme von unvorbehandeltem Tumorgewebe und *Ex-vivo*-Inkubation mit Platinkomplexen möglich. Die Messung direkt im Tumormaterial individueller Patienten wäre also denkbar und wünschenswert. Da sowohl der Zugriff auf Tumorgewebe als auch die Aufarbeitung und Inkubation der so erhaltenen Tumorzellen schwierig ist, ist

die Untersuchung der Adduktbildung in Leukozyten als Surrogatparameter eine viel versprechende Strategie<sup>109,110</sup>.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Quantifizierung der DNA-Platinierung große Bedeutung bei der Charakterisierung der Platinsensitivität besitzt und bei der Untersuchung von Resistenzmechanismen wichtige Beiträge liefern kann.

### 4.3 Geschwindigkeit der DNA-Reparatur

Nach Inkubation mit Cisplatin gebildete Platin-DNA-Addukte können von den Zellen durch verschiedene Mechanismen repariert werden (Kap. 1.3.1). Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, mit welcher Geschwindigkeit die Addukte abnehmen und welche Unterschiede zwischen cisplatinsensitiver und -resistenter Zelllinie auftreten.

Vergleicht man die Reparaturgeschwindigkeit der beiden Zelllinien A2780 und A2780 cis bei gleicher Cisplatinkonzentration im Medium, so stellt man fest, dass die Reparatur bei der sensitiven Zelllinie deutlich schneller ablief als bei der resistenten Variante. Um nun ausschließen zu können, dass es sich hierbei nur um eine Auswirkung der unterschiedlichen Platinausgangskonzentrationen zu Beginn der Reparatur handelte, wurde der Versuch nochmals bei der resistenten Zelllinie mit einer Cisplatinkonzentration von 400  $\mu\text{M}$  durchgeführt. Die Veränderung der Addukte erfolgte nun in ähnlicher Größenordnung und bei der resistenten Zelllinie A2780 cis war im Mittel die Abnahme des Platin-Nukleotid-Verhältnisses nach 2 und 4 h sogar etwas höher.

Beim Vergleich der Reparaturgeschwindigkeit der beiden Zelllinien HeLa und HeLa CK zeigt sich ein ähnliches Bild. Hier wurde direkt eine höhere Cisplatinkonzentration gewählt, um vergleichbare Platin-Nukleotid-Verhältnisse zu Beginn der Reparatur zu erhalten. Nach 8 Stunden Reparaturzeit war kein Unterschied zwischen den beiden Zelllinien zu erkennen. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine veränderte Adduktreparatur in den resistenten Zelllinien unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht zu beobachten war.

Die Ergebnisse, die sich in der Literatur finden, sind widersprüchlich (s. Tab. 4.1). Es gibt eine Reihe von Arbeitsgruppen, die Unterschiede in der Adduktreparatur zwischen cisplatinsensitiver und -resistenter Zelllinie finden; andere wie auch diese Arbeit finden keinen Unterschied. Es ist auffällig, dass die verwendeten Bestimmungsmethoden sehr

unterschiedlich sind. So werden mittels AAS die Gesamtaddukte gemessen; andere Bestimmungsmethoden lassen jedoch eine Differenzierung der Addukte zu oder bestimmen nur die Interstrand-crosslinks (ICL). Daher könnten auch die Bestimmungsmethoden zu den unterschiedlichen Ergebnissen beigetragen haben.

Tab. 4.1 Veröffentlichungen zur Untersuchung der DNA-Reparatur

Referenz	Zelllinienart	Reparatur-Zeit [h]	Bestimmungsmethode	Korrektur um DNA-Neusynthese	Unterschiede bei Reparatur
Bungo et al. 1990 <sup>111</sup>	NSCLC	2,5 - 5,5	Elutions-Assay	ja	nein
Kelland et al. 1992 <sup>76</sup>	Hoden-CA	24 - 72	AAS	ja	ja
Chao 1994 <sup>112</sup>	Cervix-CA	4 - 24	AAS, FCM, ELISA	nein	ja
Chao 1996 <sup>79</sup>	Lymphom	2 - 24	ELISA	nein	ja
Parker et al. 1991 <sup>83</sup>	Ovarial-CA	1 - 24	AAS	ja	ja
Hill et al. 1994 <sup>84</sup>	Hoden-CA	18	LC +ELISA	nein	ja
Johnson et al. 1994 <sup>86</sup>	Ovarial-CA	12	AAS, RAGE	nein	ja
Johnson et al. 1996 <sup>85</sup>	Leber-CA	8	AAS, RAGE	nein	nein
Johnson et al. 1997 <sup>113</sup>	Ovarial-CA	8	AAS	nein	nein

Weiterhin ist sichtbar, dass die maximal untersuchten Reparaturzeiten über eine große Zeitspanne streuen (5,5 - 72 h). Ein Vergleich der untersuchten Reparaturzeiten mit den Ergebnissen deutet an, dass Unterschiede in der Reparaturgeschwindigkeit erst nach längeren Reparaturzeiten ins Gewicht fallen. Eine Untersuchung der Reparaturgeschwindigkeit über einen längeren Zeitraum bringt jedoch Probleme mit sich. Einerseits müssen die Cisplatinkonzentrationen bei der Inkubation vor der Reparatur sehr niedrig gewählt werden, damit die Zellen den Untersuchungszeitraum überleben. Da es zusätzlich noch zu einer Abnahme der zur Messung zur Verfügung stehenden Platinmenge kommt, besteht die Gefahr, dass die Bestimmungsgrenze

unterschieden wird und keine Quantifizierung der DNA-Platinierung möglich ist. Andererseits muss berücksichtigt werden, dass bei längerer Reparaturzeit bereits DNA-Neusynthese stattfindet. Die Bestimmung der DNA-Platinierung würde dadurch verfälscht. Die Arbeitsgruppen *Bungo et al.*, *Kelland et al.* und *Parker et al.* korrigierten die gemessene DNA-Menge durch Inkorporations-Assays mit  $^3\text{H}$ -Thymidin, mit denen der Einbau von Thymidin und damit die DNA-Neusynthese quantifiziert werden kann. Für diese Arbeit stand diese Technik nicht zur Verfügung und daher beschränkte sich die untersuchte Reparaturzeit auf maximal 8 Stunden. Daher könnten die zu geringe Reparaturzeit und die fehlende DNA-Korrektur Ursachen dafür sein, dass in den beiden untersuchten Zelllinienpaaren keine Unterschiede in der Reparaturgeschwindigkeit beobachtet werden konnten.

Hauptursache für eine gesteigerte Reparatur von platinierter DNA ist die erhöhte Expression von NER-Proteinen wie ERCC1 und XPA. Da Cisplatin die Expression von ERCC1 induzieren kann<sup>114</sup>, wäre es sinnvoll, in künftigen Untersuchungen die Zellen mit geringen Cisplatinkonzentrationen vorzueinkubieren, damit mögliche Unterschiede in Ausmaß und Geschwindigkeit der Induktion zwischen cisplatinempfindlichen und -resistenten Zellen beobachtet werden können. Außerdem sollten die Untersuchungen zu gesteigerter Reparatur bei cisplatinresistenten Zelllinien mit der Expression dieser Reparaturenzyme korreliert werden. Diese Korrelation konnte bereits in einigen Studien mit Zelllinien gezeigt werden<sup>54,115,53,52,116</sup> und auch auf die klinische Bedeutung der Expression dieser Reparaturenzyme gibt es zahlreiche Hinweise<sup>117</sup>.

Besonders bei Ovarialkarzinomen haben Untersuchungen gezeigt, dass es wichtig ist, die Faktoren, die in *In-vitro*-Modellen eine Rolle spielen, in klinischen Proben zu untersuchen. Mehr noch als die verminderte Reparatur scheint besonders die Toleranz gegenüber Platin-DNA-Addukten ein wichtiger Resistenzmechanismus bei klinisch resistenten Tumorzellen von Ovarialkarzinom-Patientinnen zu sein<sup>118</sup>. Diese Art der Resistenz kann durch Inaktivierung von Signalwegen entstehen, die an der Erkennung und der Antwort auf Platin-DNA-Addukte beteiligt sind und normalerweise die Apoptose einleiten. Ein Beispiel dafür wäre ein defektes MMR-System, welches dazu führt, dass DNA-Schäden besser toleriert werden.



#### 4.4 Uptake und Efflux

Damit Cisplatin an die DNA binden kann und so seine zytotoxische Wirkung entfalten kann, muss es in die Zelle und den Zellkern gelangen. Das Ausmaß der Akkumulation von Cisplatin in der Zelle spielt dabei eine wichtige Rolle. Die Akkumulation kann durch einen verminderten Uptake oder einen verstärkten Efflux reduziert sein. Daher wurden in dieser Arbeit das Ausmaß und die Geschwindigkeit von Uptake und Efflux in den cisplatinempfindlichen und -resistenten Zelllinienpaaren untersucht. Die Versuchsbedingungen zur Bestimmung der intrazellulären Platinkonzentration in Tumorzellen wurden durch Literaturrecherche (vgl. Tab. 2.4 und 2.4) und einigen Vorversuchen ermittelt. Bei der Charakterisierung der Zelllinien zeigte sich, dass sich die empfindlichen und resistenten Zellen signifikant in ihrer Zellgröße und ihrem Zellvolumen unterscheiden. Daher wurde mit Hilfe der Zellzahl und dem mittleren Volumen das intrazelluläre Gesamtvolumen der Probe errechnet, so dass die erhaltene Platinmenge als intrazelluläre Konzentration (ng Platin / mL Zellvolumen) angegeben werden konnte.

Nach Etablierung eines Protein-Assays wäre es denkbar, in künftigen Experimenten die beiden Bezugspunkte (Zellvolumen und Proteinmenge) miteinander zu vergleichen.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen deutliche Unterschiede in der Cisplatin Aufnahme zwischen empfindlichen und resistenten Zellen. Die cisplatinresistenten Zellen akkumulierten um den Faktor 2,7 (A2780 / A2780 cis) bzw. 2,9 (HeLa / HeLa CK) weniger Platin intrazellulär als die jeweiligen cisplatinempfindlichen Zellen. Die Platinkonzentration nahm mit steigender Inkubationszeit nahezu linear zu. Bei dem Zelllinienpaar A2780 / A2780 cis war in den ersten 5 Minuten die Aufnahme der beiden Zelllinien sehr ähnlich. Ein Grund hierfür könnte sein, dass in den ersten 5 Minuten die Aufnahme maßgeblich durch passive Diffusion durch die Zellmembran bestimmt wird und erst danach aktiv durch Transportproteine. Bei dem Zelllinienpaar HeLa / HeLa CK zeigte sich jedoch schon nach 2 Minuten ein Unterschied. Ein Grund dafür könnte sein, dass hier die Aktivität von Transportproteinen im Vergleich zu den Ovarialkarzinomzelllinien erhöht ist. Bei der Untersuchung des Uptake ist zu beachten, dass immer auch gleichzeitig Efflux aus der Zelle stattfindet. Die gemessene Platinkonzentration in der Zelle kommt also letztendlich durch eine Überlagerung von Uptake und Efflux zustande. Die deutlichen Unterschiede beim Uptake und die nachfolgend diskutierten Ergebnisse

bei den Efflux-Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, dass die hier beobachteten Unterschiede maßgeblich durch einen veränderten Uptake zu erklären sind.

Damit konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre Platinkinetik ein wichtiger Faktor bei der Charakterisierung der Platinsensitivität ist. Auch in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass bei cisplatinresistenten Zellen der Uptake geringer ist (Tab. 4.2). Der verminderte Uptake hat großen Einfluss auf das Ausmaß der Adduktbildung. Je weniger Platin in der Zelle akkumuliert, desto weniger kann an die DNA binden. Im Gegensatz zur gesteigerten Reparatur handelt es sich hier um einen Resistenzmechanismus, der vor der Adduktbildung zum Tragen kommt.

Tab. 4.2 Veröffentlichungen zur Untersuchung der intrazellulären Platin-konzentration

Referenz	Zelllinien	Uptake	Efflux
Andrews et al. 1988 <sup>88</sup>	Ovarial-CA	resistente Zellen ↓↓	kein Unterschied
Hospers et al. 1990 <sup>75</sup>	SCLC	kein Unterschied	n.b.
Parker et al. 1991 <sup>83</sup>	Ovarial-CA	kein Unterschied	resistente Zellen ↑↑
Kelland et al. 1992 <sup>76</sup>	Hoden-CA	resistente Zellen ↓	n.b.
Nicolson et al. 1992 <sup>89</sup>	Leukämie	resistente Zellen ↓↓	kein Unterschied
Loh et al. 1992 <sup>90</sup>	Ovarial-CA	resistente Zellen ↓↓	kein Unterschied
Timmer-Bosscha et al. 1993 <sup>77</sup>	Hoden-CA	resistente Zellen (↓)	n.b.
Mellish et al. 1993 <sup>78</sup>	Zervix-CA	resistente Zellen ↓↓	n.b.
Hill et al. 1994 <sup>91</sup>	Hoden-CA	kein Unterschied	n.b.
Johnson et al. 1994 <sup>86</sup>	Ovarial-CA	resistente Zellen ↓↓	n.b.
Johnson et al. 1996 <sup>85</sup>	Leber-CA	resistente Zellen ↓↓	kein Unterschied
Zhengdong et al. 1996 <sup>92</sup>	Ovarial-CA	resistente Zellen ↓↓	n.b.
Lindauer et al. 1996 <sup>93</sup>	Mamma-CA	kein Unterschied	n.b.
Chau et al. 1999 <sup>95</sup>	Lungen-CA	n.b.	resistente Zellen ↑↑
Koga et al. 2000 <sup>94</sup>	Blasen-CA	resistente Zellen ↓↓	n.b.

Ein wichtiger Punkt in der Diskussion über die veränderte Akkumulation von Platin in der Zelle ist die Rolle der Transportproteine. In Zusammenhang mit dem Uptake ist besonders der Kupfertransporter CTR1 in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Wie einleitend erwähnt, gibt es zahlreiche Hinweise darauf, dass Cisplatin durch CTR1 in die Zelle transportiert werden kann und somit eine verminderte Aktivität dieses Transporters zu geringeren intrazellulären Platinkonzentrationen führt. Erste Einblicke in den Zusammenhang zwischen Kupfertransportern und der zellulären Pharmakokinetik von Platinkomplexen lieferten die Ergebnisse von *Komatsu et al.*, die eine Überexpression des Transporters ATP7B mit Cisplatinresistenz in Verbindung bringen konnten<sup>35</sup>. *Lin et al.* untermauerten den Zusammenhang zwischen Kupfertransport und Cisplatinwirkung, indem sie zeigten, dass CTR1-defiziente Hefezellen cisplatinresistent sind<sup>36</sup>. *Ishida et al.* stellten fest, dass CTR1 sowohl Kupfer als auch Cisplatin transportiert und somit die Cisplatinempfindlichkeit beeinflussen kann<sup>33</sup>. Vieles deutet darauf hin, dass Kupfer die Cisplatin Aufnahme kompetitiv hemmt und dass Cisplatin – ebenso wie Kupfer – zu einer Degradierung und Internalisierung des CTR1-Transporters führen kann. Neuere Ergebnisse haben gezeigt, dass Cisplatin den humanen CTR1-Transporter in den cisplatinempfindlichen Ovarialkarzinomzellen A2780 innerhalb einer Minute degradiert<sup>119</sup>. Eine solch rasche Degradierung von CTR1 in den empfindlichen Zellen widerspricht jedoch der Annahme, dass CTR1 für die Unterschiede im Cisplatin-Uptake zwischen empfindlichen und resistenten Zellen verantwortlich ist. Künftige Untersuchungen sollten daher darauf abzielen, die Rolle von CTR1 z.B. durch Koinkubation von Cisplatin und Kupfer sowie Expressionsanalysen näher zu charakterisieren.

Ebenso wie der Uptake ist auch ein gesteigerter Efflux ein Resistenzmechanismus, der vor der Adduktbildung stattfindet und Einfluss auf diese hat. Die Inkubationsversuche mit gleicher Cisplatinkonzentration zeigten einen deutlichen Unterschied in der Abnahme der intrazellulären Platinkonzentration bei A2780 und A2780 cis. Bei den empfindlichen Zellen A2780 kam es in den ersten 10 Minuten zu einer starken Abnahme der Konzentration um ca. 50 %. Nach 60 Minuten fiel die Konzentration jedoch nicht weiter, sondern befand sich immer noch auf diesem Niveau. Dieser Befund steht im Einklang mit Ergebnissen von *Parker et al.*, *Chau et al.* und *Loh et al.* (s. Tab. 4.2), die ebenfalls eine Abnahme in den ersten Minuten und eine anschließende Plateauphase beobachtet haben. Ursache dafür ist vermutlich, dass in die Zelle aufgenommenes Cisplatin rasch an diverse Zellbestandteile bindet und somit nicht wieder aus der Zelle

transportiert werden kann. Bei den resistenten Zellen A2780 cis war kaum eine Veränderung zu erkennen, erst nach 60 Minuten kam es zu einem geringen Abfall der Konzentration. Da die sensitiven Zellen wesentlich mehr Platin aufnahmen (vgl. Uptake) und ein Teil der Aufnahme sicherlich durch Diffusion stattfand, scheint nun nach Umkehrung des Konzentrationsgefälles in den sensitiven Zellen wieder Diffusion aus der Zelle heraus stattfinden. In die resistenten Zellen ist insgesamt weniger Platin aufgenommen worden und so ist es möglich, dass hier bereits ein Großteil des Cisplatins nicht mehr frei vorlag und somit auch nicht aus der Zelle diffundieren konnte. Diese Annahme bestätigt der nachfolgende Versuch, bei dem das Ziel war, die Ausgangskonzentrationen anzugleichen. Eine exakte Angleichung war zwar nicht zu erreichen, jedoch zeigten nun die Efflux-Kurven einen sehr ähnlichen Verlauf. In beiden Zelllinien kam es anfänglich zu einem Abfall der Konzentration, die aber im weiteren Verlauf (10 - 60 min) weitgehend gleich blieb. Demnach scheint der Efflux abhängig von der Ausgangskonzentration zu sein und die Ergebnisse lassen vermuten, dass es keine Unterschiede bezüglich des Efflux zwischen den untersuchten cisplatin-sensitiven und -resistenten Zelllinien gibt.

Bei dem Zelllinienpaar HeLa / HeLa CK wurde direkt versucht, die Anfangskonzentrationen anzugleichen. Auch hier war eine exakte Angleichung nicht erfolgreich. Die Ergebnisse der Efflux-Untersuchungen zeigen im Verlauf der Platinkonzentrationen zwar ein etwas anderes Bild, jedoch konnten hier ebenfalls keine Unterschiede zwischen sensitiven und resistenten Zellen beobachtet werden. In beiden Zelllinien lag die intrazelluläre Platinkonzentration nach 120 Minuten auf dem Anfangsniveau. Es kam im Gegensatz zu dem Zelllinienpaar A2780 / A2780 cis nicht zu einer evtl. durch Diffusion erklärbaren Abnahme der Platinkonzentration in den ersten 10 Minuten.

Die Tatsache, dass Cisplatin in der Zelle sehr rasch an verschiedenste Proteine und Nukleinsäuren bindet, könnte die Ursache dafür sein, dass in dem hier angewendeten Zelllinien-Modell keine Unterschiede im Efflux detektierbar sind. Es wäre denkbar, dass die genauere Untersuchung von noch kürzeren Effluxzeiten Unterschiede hervorbringt. Um Diffusionseffekte auszuschließen, sollte die Inkubationskonzentration nicht zu hoch sein. Eine weitere Möglichkeit wäre die Messung der Platinkonzentration im Medium, um die Platinmenge zu quantifizieren, die aus der Zelle wieder heraustransportiert wurde. Da das Volumen des Mediums im Vergleich zum Zellvolumen hoch ist, könnte die Platinkonzentration im Medium für einen solchen Versuch jedoch zu gering sein, um sie mittels AAS zu quantifizieren.

Vergleicht man die Ergebnisse dieser Arbeit mit anderen Arbeiten aus der Literatur, so wird deutlich, dass in den meisten Fällen ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Zelllinien beobachtet wurden (Tab. 4.2).

Wie in der Einleitung beschreiben, gibt es deutliche Hinweise darauf, dass Kupfereffluxpumpen vom Typ ATP7A oder ATP7B am Efflux von Cisplatin beteiligt sind. Wie Abb. 1.10 zeigt, sind diese Effluxpumpen an den Trans-Golgi-Vesikeln lokalisiert. Selbst wenn die Zelle in der Lage ist, durch diese Transporter die intrazelluläre Platin-konzentration zu reduzieren, wäre dies durch das verwendete oder ein ähnliches Modell zur Untersuchung des Efflux nicht detektierbar, da sich das Platin zwar nicht mehr im Zytoplasma aber noch in der Zelle befindet. Neben der Untersuchung des sehr frühen Efflux könnte daher auch eine etwas längere Beobachtung der intrazellulären Platin-konzentration interessant sein. Auf jeden Fall sollten künftige Untersuchungen den Einfluss der Hemmung der ATPasen charakterisieren und die Ergebnisse mit Expressionsanalysen vergleichen.

Neben den Kupfertransportern wird auch die Rolle von MRP2 und MRP6 beim Efflux von Platin diskutiert<sup>37,41</sup>. Durch die intrazelluläre Reaktion von Platinkomplexen mit Glutathion werden inaktive Platin-Glutathion-Konjugate gebildet, welche durch MRP2 aktiv aus der Zelle heraus transportiert werden können. Da die Ergebnisse dieser Arbeit keine Unterschiede im Efflux zwischen sensitiven und resistenten Zellen zeigen konnten, scheint eine unterschiedliche Aktivität von MRP2 in den untersuchten Zellen für die Resistenz nicht von Bedeutung zu sein. Da sowohl die Glutathionsynthese als auch die Aktivität von MRP2 durch Cisplatin induzierbar ist<sup>39</sup>, sollte in künftigen Experimenten untersucht werden, ob und wie sich eine Vorinkubation mit geringer, nicht zytotoxischer Cisplatin-konzentration auf die untersuchten Parameter auswirkt. Diese Strategie ist auch bei der Untersuchung des Uptake sinnvoll.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in den untersuchten Zelllinienpaaren ein deutlicher Unterschied beim Uptake und kein Unterschied beim Efflux zu beobachten war. Der verminderte Uptake in den resistenten Zellen führt letztendlich zu der ebenfalls beobachteten Abnahme der DNA-Platinierung und ist daher ein wichtiger Parameter zur Charakterisierung der Platinsensitivität und bei der Untersuchung von Resistenzmechanismen. Außerdem ist die Beeinflussung des Uptake ein viel versprechender Ansatz zur Überwindung von Platinresistenz.

## 4.5 Anwendungen der Quantifizierung von DNA-Platinierung und intrazellulärer Platinkonzentration

Die Quantifizierung der DNA-Platinierung fand bereits im Rahmen mehrerer Kooperationen Anwendung.

Die Arbeitsgruppen der Abteilung für Molekulare Genetik des Rudjer Boskovic Institutes in Zagreb und des Institutes für Toxikologie der Universität Mainz haben herausgefunden, dass verschiedene Proteine, die eine wichtige Rolle bei der Apoptose spielen, in cisplatinresistenten Zellen eine dauerhaft verringerte Aktivität besitzen bzw. weniger exprimiert werden. Dazu gehört SAPK/JNK (stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase), die p39-Kinase und Fas-L (Ligand des Fas-Rezeptors). SAPK/JNK und p38-Kinase sind MAP-Kinasen (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen), die für die Signalübertragung in der Zelle als Reaktion auf Stressfaktoren wichtig sind. Der Fas-Ligand (Fas-L) bindet an den Fas-Rezeptor. Dieser gehört als Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor (TNF-R) zur Gruppe der Todesrezeptoren. Bindung von Fas-L führt zur Trimerisierung des Fas-Rezeptors, was durch Ausbildung der Todesdomäne und Aktivierung der Caspasen-Kaskade zur Einleitung der Apoptose führt.

Die oben genannten Untersuchungen haben ergeben, dass die Expression von Fas-L in cisplatinresistenten Zellen erniedrigt ist und dass die cisplatininduzierte Aktivierung von SAPK/JNK und p38-Kinase in cisplatin sensitiven Zellen signifikant höher ist. Um die Ursachen für diese Veränderungen zu untersuchen, wurde die DNA-Platinierung in den verwendeten Zelllinien (HeLa und HeLa CK) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Kap. 3.2.3 dargestellt. Die verminderte DNA-Platinierung in den cisplatinresistenten Zellen könnte darauf hindeuten, dass die Aktivierung von SAPK/JNK und p38-Kinase durch nicht-reparierte cisplatininduzierte DNA-Schäden hervorgerufen wurde. Da die resistenten Zellen weniger Schäden aufwiesen, war die Aktivierung der Signalübertragungswege erniedrigt<sup>120</sup>.

In einer weiteren Kooperation mit dem Institut für Toxikologie der Universität Mainz wurden Hamster-Fibroblasten (V79B) und eine daraus gewonnene Zelllinie CL-V5B untersucht, die hypersensitiv gegenüber Cisplatin ist. Erstaunlicherweise waren sowohl DNA-Platinierung als auch die intrazellulären Platinkonzentrationen in der hypersensitiven Zelllinie geringer als in der parentalen. Da diese Ergebnisse den

Resultaten der hier vorliegenden Arbeit und zahlreichen Resultaten aus der Literatur widersprechen, müssen nun weitere Untersuchungen klären, wie es zu diesen unerwarteten Unterschieden bei der Akkumulation und Adduktbildung kommt und welche Faktoren oder Gene daran beteiligt sind. Möglicherweise hat in den hypersensitiven Zellen eine Mutation stattgefunden, die dazu beiträgt, dass schon ein relativ geringes Maß an DNA-Platinierung einen zytotoxischen Effekt auslöst.

In Kooperation mit dem Westdeutschen Tumorzentrum Essen wurde der Einfluss eines in der Klinischen Prüfung befindlichen Raf-Kinase-Inhibitors (Testsubstanz) auf die DNA-Platinierung und die intrazelluläre Platinkonzentration untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Koinkubation von Cisplatin oder Oxaliplatin sowohl zu einer verringerten Akkumulation als auch zu einer verringerten Adduktbildung führte.

Hier müssen weitere Versuche klären, ob es sich dabei um eine Interaktion mit Zellproteinen handelt oder ob die beiden Stoffe miteinander reagieren können und dadurch die Aktivität der Platinkomplexe herabgesetzt wird. Letzteres deuten die Ergebnisse an, die zeigen, dass es nur bei Koinkubation zu Veränderungen kommt. Bei Inkubation mit den Platinkomplexen und anschließender Inkubation mit der Testsubstanz sind kaum Unterschiede im Vergleich zur Inkubation mit den Platinkomplexen allein erkennbar. Andererseits gibt es Ergebnisse, die zeigen, dass die Testsubstanz den durch die Platinkomplexe induzierten G<sub>2</sub>-Zellzyklusarrest aufheben kann<sup>121</sup>. Diese Ergebnisse stehen jedoch in einem gewissen Widerspruch zu ersten Ergebnissen einer klinischen Studie, die zeigen, dass die Kombination mit der Testsubstanz keine negativen Effekte auf die Wirkung von Oxaliplatin nach sich zieht<sup>122</sup>.

#### **4.6 Intrazelluläre Glutathionkonzentrationen**

Das Tripeptid Glutathion kann freies Cisplatin abfangen und die gebildeten Platin-Glutathion-Addukte können durch MRP2 aus der Zelle heraustransportiert werden. Damit kann Glutathion zu einer verminderten Zytotoxizität von Cisplatin beitragen und erhöhte Glutathionkonzentrationen werden als möglicher Resistenzmechanismus diskutiert. Daher wurde in dieser Arbeit eine Methode zur Bestimmung von intrazellulären Glutathionkonzentrationen etabliert und validiert.

Die am weitesten verbreitete Methode zur Glutathion-Bestimmung ist die Methode nach Tietze und Griffith (Tab. 4.3). Hierbei wird zunächst durch Glutathion-Reduktase

sämtliches Glutathion in die reduzierte Form (GSH) überführt. Anschließend erfolgt eine Umsetzung mit Ellman's Reagenz (5,5'-Dithio-bis[2-Nitrobenzoesäure], DTNB) zu oxidiertem Glutathion (GSSG) und 2-Nitro-5-Thiobenzosäure (TNB), welche spektrophotometrisch bestimmt werden kann<sup>123,124</sup>. Diese Methode ist wie jede enzymatische Methode sehr anfällig für Störungen und nicht immer gut reproduzierbar. Eine andere Methode zur Quantifizierung von Glutathion ist die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit Fluoreszenz-Detektion nach Derivatisierung. Wie Tab. 4.3 zeigt sind dies die beiden Methoden, die am häufigsten zur Bestimmung intrazellulärer Glutathionkonzentrationen eingesetzt wurden. 1999 publizierten *Parmentier et al.* eine schnelle und sensitive kapillarelektrophoretische Methode mit laserinduzierter Fluoreszenz-Detektion zur Bestimmung von Glutathion in kultivierten Zelllinien<sup>103</sup>. Diese Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit übernommen, etabliert und nach international anerkannten Kriterien validiert.

Besonders vorteilhaft bei dieser Methode ist die Probenaufarbeitung. Die Zellen wurden direkt in der Zellkulturschale nach Hinzugabe von Perchlorsäure / Acetonitril mit einem Zellschaber abgekratzt. Dadurch wurden die Zellen zerstört, die Zellfragmente wurden abzentrifugiert und die Glutathionkonzentration wurde direkt aus dem Überstand bestimmt. Wie bei der Bestimmung der intrazellulären Platinkonzentration wurde die gemessene Glutathionmenge auf die Zellzahl bzw. das Zellvolumen bezogen.

Das Ergebnis für das Zelllinienpaar A2780 / A2780 cis zeigt, dass die intrazelluläre Glutathionkonzentration in den resistenten Zellen signifikant höher war als in den sensitiven (Faktor 1,5).

Auch bei der Erhöhung der Glutathionkonzentration handelt es sich um einen Resistenzmechanismus, der vor Bildung der Addukte eine Rolle spielt. Je mehr Glutathion in der Zelle vorhanden ist, desto mehr Cisplatin kann gebunden werden und steht nicht mehr für die Adduktbildung zur Verfügung. Vergleicht man den Faktor, um den sich die Zelllinien unterscheiden, mit dem Resistenzgrad (4,3), so zeigt sich, dass die Unterschiede in der Glutathionkonzentration deutlich geringer sind. Daher sollten künftige Experimente die Veränderung der intrazellulären Glutathionkonzentration nach Vorinkubation mit Cisplatin untersuchen. Es wäre möglich, dass in den resistenten Zellen eine höhere Glutathion-Synthese induziert wird und sich somit die Unterschiede in der Glutathionkonzentration noch vergrößern. Weiterhin könnte durch den Einsatz von Buthioninsulfoximin (BSO) – einem Hemmstoff der Glutathionsynthese – geprüft



werden, ob die resistenten Zellen durch Depletion von Glutathion wieder sensitiv gegenüber Cisplatin werden. Neben der Glutathionkonzentration und -synthese spielt die Aktivität der Glutathion-S-Transferase eine wichtige Rolle bei der Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin. *Goto et al.* haben die Cisplatinresistenz in Kolonkarzinomzellen HCT8 untersucht und gezeigt, dass GST $\pi$  für die Bildung der Platin-Glutathion-Addukte verantwortlich war und dass cisplatinresistente HCT8-Zellen eine erhöhte Expression von GST $\pi$  aufwiesen<sup>129</sup>. Weitere Studien zu positiven Korrelationen zwischen GST-Expression und klinischem Ansprechen einer Cisplatintherapie unterstreichen die Bedeutung dieses Enzyms<sup>70</sup>. Da es jedoch auch gegenteilige Studien gibt, bedarf es weiterer Untersuchungen, um die Rolle von GST bei der Platinresistenz genauer zu charakterisieren.

Die Literaturzusammenstellung (s. Tab 4.3) zeigt, dass in vielen anderen Arbeiten ebenfalls eine Erhöhung der intrazellulären Glutathionkonzentration beobachtet werden konnte. Insgesamt ist das Ergebnis jedoch nicht einheitlich und viele Arbeitsgruppen konnten keine Unterschiede zeigen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten an, dass die erhöhte Glutathionkonzentration in der resistenten Zelllinie zur Resistenz beiträgt und ebenfalls als Parameter zur Charakterisierung der Platinsensitivität herangezogen werden sollte.

Tab. 4.3 Veröffentlichungen zu intrazellulären Glutathionkonzentrationen

Referenz	Zelllinienart	Bestimmungsmethode	Bezugsgröße	Ergebnis
Hospers et al. 1990 <sup>75</sup>	SCLC	Tietze / Griffith	Protein	resistente Zellen ↑
Nicolson et al. 1992 <sup>89</sup>	Leukämie	Tietze / Griffith	Protein	keine Unterschiede
Kelland et al. 1992 <sup>76</sup>	Hoden-CA	Tietze / Griffith	Protein / Zellzahl	keine Unterschiede
Meijer et al. 1992 <sup>44</sup>	SCLC / Hoden-CA	k.A.	k.A.	resistente Zellen ↑
Mellish et al. 1993 <sup>78</sup>	Zervix-CA	Tietze / Griffith	Protein / Zellzahl	keine Unterschiede
Hill et al. 1994 <sup>84</sup>	Hoden-CA	Tietze / Griffith	Protein	keine Unterschiede
Chen et al. 1995 <sup>125</sup>	Ovarial-CA	Tietze / Griffith	Zellzahl	resistente Zellen ↑
Sugimoto et al. 1996 <sup>126</sup>	Rachen-CA	HPLC + FD	Zellzahl	resistente Zellen ↑
Pendyala et al. 1997 <sup>127</sup>	Melanom	HPLC + FD	Protein	kein Vergleich
Newkirk et al. 1997 <sup>128</sup>	Kopf / Nacken-CA	Tietze / Griffith	Protein	resistente Zellen ↑
Goto et al. 1999 <sup>129</sup>	Colon-CA	Tietze / Griffith	Zellzahl	keine Unterschiede
Koga et al. 2000 <sup>130</sup>	Blasen-CA	Tietze / Griffith	Protein	keine Unterschiede
Yang et al. 2000 <sup>76</sup>	Kopf / Nacken-CA	Tietze / Griffith	Protein	resistente Zellen ↑
Borud et al. 2000 <sup>131</sup>	Colon-CA	HPLC + FD	Protein	resistente Zellen (↑)
Ikeda et al. 2001 <sup>132</sup>	Phäochromozytom	HPLC + FD	Protein	resistente Zellen ↑
Zhang et al. 2001 <sup>133</sup>	Leber-CA	Kolorimetrisch	Zellzahl	schwache Tendenz resistente Zellen (↑)
Fokkera et al. 2002 <sup>134</sup>	diverse	Tietze / Griffith	Zellzahl	resistente Zellen ↑

## **4.7 Bedeutung der verschiedenen Parameter für die quantitative Beurteilung der Platinsensitivität**

Der Vergleich der in dieser Arbeit untersuchten Parameter für die quantitative Beurteilung der Platinsensitivität in Tab. 3.18 zeigt die Bedeutung der einzelnen Parameter.

Eine Veränderung in der Sensitivität gegenüber Cisplatin kann mit dem Resistenzgrad quantifiziert werden. Die anderen Parameter dienen dazu, die bestehende Sensitivität bzw. Resistenz zu charakterisieren und Anhaltspunkte zum zugrundelegenden Mechanismus zu erhalten. Als zentrale Parameter spielt die DNA-Platinierung bzw. die Unterschiede in der Adduktbildung eine wichtige Rolle. Bei den Zelllinienpaaren 2102 / 2102 Klon B und A2780 / A2780 cis korrelieren der Resistenzgrad und das Adduktverhältnis in hohem Maße. Wie am Beispiel des Zelllinienpaares HeLa / HeLa CK zu sehen ist, kann die Adduktbildung alleine nicht in allen Fällen eine bestehende Resistenz erklären. Daher sind auch die weiteren Parameter zur Charakterisierung der Platinsensitivität von Bedeutung. So ist ersichtlich, dass auch beim Uptake deutliche Unterschiede zwischen den sensitiven und resistenten Zelllinien zu beobachten sind. Bei dem Zelllinienpaar HeLa / HeLa CK wird sogar deutlich, dass die Unterschiede im Uptake besser mit dem Resistenzgrad korrelieren als das Adduktverhältnis. Auch bei den intrazellulären Glutathionkonzentrationen zeigten sich Unterschiede, die zur beobachteten Resistenz beitragen.

## **4.8 Schlussfolgerung und Ausblick**

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Resistenz ein Zusammenwirken verschiedener Faktoren ist und dass es abhängig von der untersuchten Zelllinie ist, welche Resistenzmechanismen zum Tragen kommen. Die Art und Weise, wie die Zellen resistent gezüchtet worden sind, die Bedingungen bei der Kultivierung und die Herkunft der Zelllinie haben einen Einfluss auf die Resistenzentwicklung. Es wird deutlich, dass Platinresistenz nicht durch einen einzelnen Parameter charakterisiert werden kann, sondern dass erst die gemeinsame Betrachtung verschiedener Parameter eine quantitative Beurteilung der Platinsensitivität zulässt.

Aus den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen ergeben sich neue Strategien zur Überwindung von Platinresistenz. Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass sämtliche Prozesse, die nach Gabe von Platinkomplexen letztendlich zum Zelltod führen, vom Ausmaß der Adduktbildung abhängen. Daher ist die Aufrechterhaltung eines bestimmten DNA-Platinierungsgrades eine vielversprechende Strategie, um die Entstehung einer Resistenz gegen Platinkomplexe zu verhindern. Ein wichtiger Punkt dabei ist die Untersuchung von Transportproteinen. Die funktionelle Charakterisierung des am Uptake beteiligten Kupfertransporters CTR1 und von MRP2, das Platin-Glutathion-Addukte aus der Zelle heraustransportiert, sollte dabei zusammen mit Expressionsanalysen dieser Transporter im Mittelpunkt stehen.

Weiterhin sollte die Adduktbildung selbst näher charakterisiert werden. Die bisherigen Untersuchungen haben sich auf die Quantifizierung der Platin-DNA-Addukte beschränkt. Für den zytotoxischen Effekt von Cisplatin könnten jedoch auch Addukte der RNA oder mRNA von Bedeutung sein. Bei der Untersuchung der Reparatur von Addukten sollte neben der Reparaturkinetik auch die Expression der verantwortlichen Reparaturenzyme – insbesondere ERCC1 – einbezogen werden.

Da sich gezeigt hat, dass die intrazelluläre Glutathionkonzentration eine Rolle bei der Cisplatinresistenz zu spielen scheint, sollten Untersuchungen zur Hemmung der Glutathionsynthese und zur Aktivität der Glutathion-S-Transferase das Bild ergänzen.

Eine Übertragung der in dieser Arbeit entwickelten Methoden auf künftige Untersuchungen an Tumorzellen von individuellen Patienten erscheint möglich und könnte die Erstellung eines individuellen Sensitivitätsprofils ermöglichen.

Ein Ziel für die Zukunft sollte daher sein, die hier anhand von Tumorzelllinien gewonnenen Erkenntnisse auf Untersuchungen an Tumorzellen des individuellen Patienten zu übertragen. Dabei sollten auf Expressionsanalysen mit funktionellen Untersuchungen der verschiedenen Sensitivitätsparameter kombiniert werden. Ein auf diese Weise erstelltes Sensitivitätsprofil kann einen wichtigen Beitrag zur Überwindung von klinisch relevanter Resistenz und Individualisierung platinhaltiger Chemotherapie darstellen.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden anhand cisplatinempfindlicher und -resistenter Tumorzelllinien verschiedene Parameter zur Charakterisierung der Platinsensitivität untersucht. Das Ausmaß der DNA-Platinierung hat einen hohen prädiktiven Wert im Hinblick auf das Tumorsprechen. Die Quantifizierung der DNA-Platinierung spielt daher eine wichtige Rolle bei der Charakterisierung der Platinsensitivität und korreliert mit dem Resistenzgrad. Als weitere wichtige Parameter mit Einfluss auf die Adduktbildung wurden Adduktreparatur, intrazelluläre Platinkonzentration (Uptake und Efflux) sowie intrazelluläre Glutathionkonzentrationen untersucht. Zur Quantifizierung der Glutathionkonzentrationen wurde eine kapillarelektrophoretische Methode mit Laser-induzierter Fluoreszenz-Detektion etabliert und validiert. Für sämtliche Parameter wurden in dieser Arbeit Versuchsbedingungen entwickelt und die Unterschiede in cisplatinempfindlichen und -resistenten Zelllinien untersucht. Durch die Bestimmung des Resistenzgrades der cisplatinresistenten Zelllinien konnten die Unterschiede in der Platinsensitivität charakterisiert werden. Bei der DNA-Platinierung zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen cisplatinempfindlichen und -resistenten Zelllinien, die eng mit dem Resistenzgrad korrelieren. Die Untersuchungen zum Uptake zeigten, dass die intrazellulären Platinkonzentrationen während Inkubation mit Cisplatin in den untersuchten cisplatinresistenten Zellen deutlich erniedrigt waren. Dahingegen gab es bei dem Efflux kaum Unterschiede. Ebenso war die DNA-Reparaturgeschwindigkeit in den cisplatinempfindlichen und -resistenten Zelllinien vergleichbar. Die Bestimmung der intrazellulären Glutathionkonzentration zeigte, dass diese in der untersuchten cisplatinresistenten Zelllinie erhöht war. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass neben der DNA-Platinierung besonders der Uptake und die intrazellulären Glutathionkonzentrationen für die Charakterisierung der Platinsensitivität wichtig sind. Diese Ergebnisse geben neue Ansatzpunkte zur Charakterisierung der Platinsensitivität, bei denen durch die gemeinsame Betrachtung verschiedener Resistenzmechanismen die Platinsensitivität quantitativ beurteilt werden kann. Sie können einen Beitrag leisten bei der Entwicklung neuer Strategien zur Überwindung von Platinresistenz und Individualisierung platinhaltiger Chemotherapie.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Peyrone M. *Über die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorür*. Ann Chem Pharm 1844; 51: 1-29
- [2] Rosenberg B. *Platinum complexes for the treatment of cancer: Why the search goes on*. In: Lippert B (Hrsg.): *Cisplatin*. Verlag Helvetica Chimica Acta, Wiley-VCH, Zürich/Weinheim, 1999; 3-27
- [3] Highley MS, Calvert AH. *Clinical experience with cisplatin and carboplatin*. In: Kelland L, Farrel N (Hrsg.): *Platinum-based drugs in cancer therapy*. Humana Press, Totowa New Jersey, 2000; 171-194
- [4] Hartmann J, Lipp H. *Toxicity of platinum compounds*. Expert Opin Pharmacother 2003; 4: 889-901
- [5] Giaccone G. *Clinical perspectives on platinum resistance*. Drugs 2000; 59 (Suppl. 4): 9-17
- [6] O'Dwyer PJ, Stevenson JP, Johnson SW. *Clinical status of cisplatin, carboplatin and other platinum-based antitumor drugs*. In: Lippert B (Hrsg.): *Cisplatin*. Verlag Helvetica Chimica Acta, Wiley-VCH, Zürich/Weinheim, 1999; 31-69
- [7] Burchenal JH, Kalahar K, O'Toole T, Chisholm J. *Lack of cross-resistance between certain platinum coordination compounds in mouse leukemia*. Cancer Res 1977; 37: 3455-3457
- [8] O'Dwyer PJ, Stevenson JP, Johnson SW. *Clinical experience - DACH-based platinum drugs*. In: Kelland L, Farrel N (Hrsg.): *Platinum-based drugs in cancer therapy*. Humana Press, Totowa New Jersey, 2000; 231-249
- [9] Berners-Price SJ, Appleton TG. *The chemistry of cisplatin in aqueous solution*. In: Kelland L, Farrel N (Hrsg.): *Platinum-based drugs in cancer therapy*. Humana Press, Totowa New Jersey, 2000; 3-35
- [10] Fink D, Howell SB. *How does cisplatin kill cells?* In: Kelland L, Farrel N (Hrsg.): *Platinum-based drugs in cancer therapy*. Humana Press, Totowa New Jersey, 2000; 149-167
- [11] Zamble DB, Lippard SJ. *Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy*. Trends Biochem Sci 1995; 20: 435-9
- [12] Eastman A. *The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes*. Pharmacol Ther 1987; 34: 155-166
- [13] Scheeff ED, Briggs JM, Howell SB. *Molecular modeling of the intrastrand guanine-guanine DNA adducts produced by cisplatin and oxaliplatin*. Mol Pharmacol 1999; 56: 633-643
- [14] Lilley DMJ. *Cisplatin adducts in DNA: Distortion and recognition*. J Biol Inorg Chem 1996; 1: 189-191
- [15] Veal GJ, Dias C, Price L, Parry A, Errington J, Hale J, Pearson AD, Boddy AV, Newell DR, Tilby MJ. *Influence of cellular factors and pharmacokinetics on the formation of platinum-DNA adducts in leukocytes of children receiving cisplatin therapy*. Clin Cancer Res 2001; 7: 2205-2212
- [16] Eickhoff C. *Behandlung heterogener Patientenkollektive mit platinhaltiger Chemotherapie: Strategien zur Dosierungsoptimierung*. Freie Universität Berlin, Dissertation 1997; 144-153

- [17] Fichtinger-Schepman AMJ, van Oosterom AT, Lohman PHM, Berends F. *Interindividual human variation in cisplatin sensitivity, predictable in an in vitro assay?* Mutat Res 1987; 190: 59-62
- [18] Williams SD, Birch R, Einhorn LH, Irwin L et al. *Treatment of disseminated germ-cell tumors with cisplatin, bleomycin, and either vinblastine or etoposide.* N Engl J Med 1987; 316: 1435-1440
- [19] De Wit R. *Treatment of disseminated non-seminomatous testicular cancer: the European experience.* Semin Surg Oncol 1999; 17: 250-256
- [20] McKeage MJ. *Clinical toxicology of platinum-based cancer chemotherapeutic agents.* In: Kelland L, Farrel N (Hrsg.): *Platinum-based drugs in cancer therapy.* Humana Press, Totowa New Jersey, 2000; 251-275
- [21] Faivre S, Kalla S, Cvitkovic E, Bourdon O, Hauteville D, Dourte LM, Bensmaine MA, Itzhaki M, Marty M, Extra JM. *Oxaliplatin and paclitaxel combination in patients with platinum-pretreated ovarian carcinoma. An investigator-originated compassionate-use experience.* Ann Oncol 10: 1125-1128, 1999
- [22] Zamable DB, Lippard SJ. *The response of cellular proteins to cisplatin-damaged DNA.* In: Lippert B (Hrsg.): *Cisplatin.* Verlag Helvetica Chimica Acta, Wiley-VCH, Zürich/Weinheim, 1999; 73-110
- [23] Reardon JT, Vaisman A, Chaney SG, Sancar A. *Efficient nucleotide excision repair of cisplatin, oxaliplatin, and Bis-aceto-ammine-dichloro-cyclohexylamine-platinum(IV) (JM216) platinum intrastrand DNA diadducts.* Cancer Res 1999; 59: 3968-3971
- [24] Jordan P, Carmo-Fonseca M. *Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity.* Cell Mol Life Sci 2000; 57: 1229-1235
- [25] Billings PC, Davis RJ, Engelsberg BN, Skov KA, Hughes EN. *Characterization of high mobility group protein binding to cisplatin-damaged DNA.* Biochem Biophys Res Commun 1992; 188: 1286-1294
- [26] Chaney SG, Vaisman A. *Specificity of platinum-DNA adduct repair.* J Inorg Biochem 1999; 77: 71-81
- [27] Jordan P, Carmo-Fonseca M. *Cisplatin inhibits synthesis of ribosomal RNA in vivo.* Nucleic Acids Res 1998; 26: 2831-2836
- [28] Zhai X, Beckmann H, Jantzen HM, Essigmann JM. *Cisplatin-DNA adducts inhibit ribosomal RNA synthesis by hijacking the transcription factor human upstream binding factor.* Biochemistry 1998; 37: 16307-16415
- [29] Materna VW. *Bedeutung des ABC-Transporters MRP2/cMOAT/ABCC2 bei der Cisplatinresistenz humaner Tumorzellen.* Humboldt-Universität Berlin, 2002
- [30] Katano K, Kondo A, Safaei R, Holzer A, Samimi G, Mishima M, Kuo YM, Rochdi M, Howell SB. *Acquisition of resistance to cisplatin is accompanied by changes in the cellular pharmacology of copper.* Cancer Res 2002; 62: 6559-6565
- [31] Ehrenthal W. *Kupfer-Stoffwechsel und Morbus Wilson.* Klinikum Johannes Gutenberg-Universität Mainz. [http://www-klinik.uni-mainz.de/Zentrallabor/Lab-Web/Kupfer\\_Stoffwechsel.htm](http://www-klinik.uni-mainz.de/Zentrallabor/Lab-Web/Kupfer_Stoffwechsel.htm)
- [32] Kruh GD. *Lustrous Insights into cisplatin accumulation: copper transporters.* Clin Cancer Res 2003; 9: 5807-5809
- [33] Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I. *Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals.* Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 14298-14302

- [34] Holzer AK, Katano K, Klomp LWJ, Howell SB. *Cisplatin rapidly down-regulates its own influx transporter hCTR1 in cultured human ovarian carcinoma cells*. Clin Cancer Res 2004; 10: 6744-6749
- [35] Komatsu M, Somizawa T, Mutoh M, Chen ZS, Terada K, Furukawa T, Yang XL, Gao H, Miura N, Sugiyama T, Akiyama S. *Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is associated with cisplatin resistance*. Cancer Res 2000; 60: 1312-1316
- [36] Lin X, Okuda T, Holzer A, Howell SB. *The copper transporter CTR1 regulates cisplatin uptake in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Pharmacol 2002; 62: 1154-1159
- [37] Ishikawa F, Ali-Osman F. *Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance*. J Biol Chem 1993; 268: 20116-20125
- [38] Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Center M, Cole SP, Deeley RG, Keppler D. *ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump*. Biochem J 1996; 314: 433-437
- [39] Ishikawa T, Bao JJ, Yamene Y, Akimaru K, Frindrich K, Wright CD, Kuo MT. *Coordinated induction of MRP/GS-X pump and  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase by heavy metals in human leukemia cells*. J Biol Chem 1996; 271: 14981-14988
- [40] Liedert B, Materna V, Schadendorf D, Thomale J, Lage H. *Overexpression of cMOAT (MRP2/ABCC2) is associated with decreased formation of platinum-DNA adducts and decreased G<sub>2</sub>-arrest in melanoma cells resistant to cisplatin*. J Invest Dermatol 2003; 121: 172-176
- [41] Kruh GD, Belinsky MG. *The MRP family of drug efflux pumps*. Oncogene 2003; 22: 7537-7552
- [42] Lai GM, Ozols RF, Young RC, Hamilton TC. *Effect of glutathione on DNA repair in cisplatin-resistant human ovarian cancer cell lines*. J Natl Cancer Inst 1989; 81: 535-539
- [43] Chen G, Hutter KJ, Zeller WJ. *Positive correlation between cellular glutathione and acquired cisplatin resistance in human ovarian cancer cells*. Cell Biol Toxicol 1995; 11: 273-281
- [44] Meijer C, Mulder NH, Hospers GA, Uges DR, de Vries EG. *The role of glutathione in resistance to cisplatin in a human small cell lung cancer cell line*. Br J Cancer 1990; 62: 72-7
- [45] Ikeda K, Miura K, Himeno S, Imura N, Naganuma A. *Glutathione content is correlated with the sensitivity of lines of PC12 cells to cisplatin without a corresponding change in the accumulation of platinum*. Mol Cell Biochem 2001; 219: 51-6
- [46] Iida M, Doi H, Asamoto S et al. *Effect of glutathione-modulating compounds on platinum compounds-induced cytotoxicity in human glioma cell lines*. Anticancer Res 1999; 19: 5383-5384
- [47] Meijer C, Mulder NH, Timmer-Bosscha H, Sluiter WJ, Meersma GJ, de Vries EG. *Relationship of cellular glutathione to the cytotoxicity and resistance of seven platinum compounds*. Cancer Res 1992; 52: 6885-6889
- [48] Tew KD. *Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance*. Cancer Res 2004; 54: 4313-4320
- [49] Kasahara K, Fujiwara Y, Nishio K et al. *Metallothionein content correlates with the sensitivity of human small cell lung cancer cell lines to cisplatin*. Cancer Res 1991; 51: 3237-3242



- [50] Meijer C, Timmer A, de Vries EG et al. *Role of metallothionein in cisplatin sensitivity of germ-cell tumours*. Int J Cancer 2000; 85: 777-781
- [51] Koberle B, Masters JR, Hartley JA, Wood RD. *Defective repair of cisplatin-induced DNA damage caused by reduced XPA protein in testicular germ cell tumours*. Curr Biol 1999; 9: 273-276.
- [52] Britten RA, Liu D, Tessier A, Hutchison MJ, Murray D. *ERCC1 expression as a molecular marker of cisplatin resistance in human cervical tumor cells*. Int J Cancer 2000; 89: 453-457
- [53] Li Q, Yu JJ, Mu C et al. *Association between the level of ERCC-1 expression and the repair of cisplatin-induced DNA damage in human ovarian cancer cells*. Anticancer Res 2000; 20: 645-652
- [54] Ferry KV, Hamilton TC, Johnson SW. *Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells: role of ERCC1-XPF*. Biochem Pharmacol 2000; 60: 1305-1313
- [55] Akiyama S, Chen ZS, Sumizawa T, Furukawa T. *Resistance to cisplatin*. Anticancer Drug Des 1999; 14: 143-151
- [56] Nehme A, Baskaran R, Nebel S, Fink D, Howell SB, Wang JY, Christ RD. *Induction of JNK and c-AB1 signalling by cisplatin and oxaliplatin in mismatch repair-proficient and -deficient cells*. Br J Cancer 1999; 79: 1104-1110
- [57] Fink D, Nebel S, Aebi S, Zheng H, Cenni B, Nehme A, Christen RD, Howell SB. *The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance*. Cancer Res 1996; 56: 4881-4886
- [58] Faivre S, Chan D, Salinas R, Woynarowska B, Woynarowski JM. *DNA strand breaks and apoptosis induced by oxaliplatin in cancer cells*. Biochem Pharm 2003; 66: 225-237
- [59] Manic S, Gatti L, Carenini N, Fumagalli G, Zunino F, Perego P. *Mechanisms controlling sensitivity to platinum complexes: role of p53 and DNA mismatch repair*. Curr Cancer Drug Targets; 3: 21-29
- [60] Nakayama K, Kanzaki A, Ogawa K, Miyazaki K, Neamati N, Takebayashi Y. *Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) as a cisplatin based chemoresistance marker in ovarian carcinoma: comparative analysis with expression of MDR1, MRP1, MRP2, LRP and BCRP*. Int J Cancer 2002; 101: 488-495
- [61] Kanzaki A, Nakayama K, Miyashita H, Shirata S, Nitta Y, Oubu M, Higashimoto M, Mutoh M, Mori S, Konno S, Ogawa K, Toi M, Takebayashi Y. *Mutation analysis of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) in human solid carcinomas*. Anticancer Res 2003; 23: 1913-1915
- [62] Higashimoto M, Kanzaki A, Shimakawa T, Konno S, Naritaka Y, Nitta Y, Mori S, Shirata S, Yoshida A, Terada K, Sugiyama T, Ogawa K, Takebayashi Y. *Expression of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase in human esophageal carcinoma*. Int J Mol Med 2003; 11: 337-341
- [63] Calvert P, Yao KS, Hamilton TC, O'Dwyer PJ. *Clinical studies of reversal of drug resistance based on glutathione*. Chem Biol Interact 1998; 111-112: 213-224
- [64] Sprem M, Babic D, Abramic M et al. *Glutathione and glutathione S-transferases as early markers for ovarian carcinomas: case series*. Croat Med J 2001; 42: 624-629
- [65] Tew KD. *Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance*. Cancer Res 1994; 54: 4313-4320

- [66] Dabholkar M, Vionnet J, Bostick-Brunton F, et al. *Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy.* J Clin Invest 1994; 94: 703-708
- [67] Fink D, Nebel S, Norris PS et al. *Enrichment for DNA mismatch repair-deficient cells during treatment with cisplatin.* Int J Cancer 1998; 77: 741-746
- [68] Scartozzi M, Bianchi F, Rosati S, Galizia E, Antolini A, Loretelli C, Piga A, Bearzi I, Cellerino R, Porfiri E. *Mutations of hMLH1 and hMSH2 in patients with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer: correlation with microsatellite instability and abnormalities of mismatch repair protein expression.* J Clin Oncol 2002; 20: 1203-1208
- [69] Fink D, Zheng H, Nebel S et al. *In vitro and in vivo resistance to cisplatin in cells that have lost DNA mismatch repair.* Cancer Res 1997; 57: 1841-1845
- [70] Siddik ZH. *Biochemical and molecular mechanisms of cisplatin resistance.* In: Andersson B, Murray D (Hrsg.): *Clinically relevant resistance in cancer chemotherapy.* Kluwer Academic Publishers Group, Dordrecht, 2002; 263-284
- [71] Behrens BC, Hamilton TC, Masuda H, Grotzinger KR, Whang-Peng J, Louie KG, Knutsen T, McKoy WM, Young RC, Ozols RF. *Characterization of a cis-diamminedichloroplatinum(II)-resistant human ovarian cancer cell line and its use in evaluation of platinum analogues.* Cancer Res 1987;47: 414-418
- [72] Osmak M, Eljuga D. *The characterization of two human cervical carcinoma HeLa sublines resistant to cisplatin.* Res Exp Med 1993; 193: 389-396
- [73] Kawada K, Yonei T, Ueoka H, Kiura K, Tabata M, Takigawa N, Harada M, Tanimoto M. *Comparison of chemosensitivity tests: clonogenic assay versus MTT assay.* Acta Med Okayama 2002; 56: 129-134
- [74] Mueller H, Kassack MU, Wiese M. *Comparison of the usefulness of the MTT, ATP, and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines.* J Biomol Screen 2004; 9: 506-515
- [75] Hospers GA, de Vries EG, Mulder NH. *The formation and removal of cisplatin (CDDP) induced DNA adducts in a CDDP sensitive and resistant human small cell lung carcinoma (HSCLC) cell line.* Br J Cancer 1990; 61: 79-82
- [76] Kelland LR, Mistry P, Abel G et al. *Establishment and characterization of an in vitro model of acquired resistance to cisplatin in a human testicular nonseminomatous germ cell line.* Cancer Res 1992; 52: 1710-1716
- [77] Timmer-Bosscha H, Timmer A, Meijer C et al. *Cis-diamminedichloroplatinum(II) resistance in vitro and in vivo in human embryonal carcinoma cells.* Cancer Res 1993; 53: 5707-5713
- [78] Mellish KJ, Kelland LR, Harrap KR. *In vitro platinum drug chemosensitivity of human cervical squamous cell carcinoma cell lines with intrinsic and acquired resistance to cisplatin.* Br J Cancer 1993; 68: 240-250
- [79] Chao CC. *Cross-resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II) of a multidrug-resistant lymphoma cell line associated with decreased drug accumulation and enhanced DNA repair.* Eur J Pharmacol 1996; 305: 213-222
- [80] Yamada M, Tomida A, Yun J et al. *Cellular sensitization to cisplatin and carboplatin with decreased removal of platinum-DNA adduct by glucose-regulated stress.* Cancer Chemother Pharmacol 1999; 44: 59-64

- [81] Yang Z, Faustino PJ, Andrews PA et al. *Decreased cisplatin/DNA adduct formation is associated with cisplatin resistance in human head and neck cancer cell lines.* Cancer Chemother Pharmacol 2000; 46: 255-262
- [82] Hospers GA, Meijer C, de Leij L, Uges DR, Mulder NH, de Vries EG. *A study of human small-cell lung carcinoma (hSCLC) cell lines with different sensitivities to detect relevant mechanisms of cisplatin (CDDP) resistance.* Int J Cancer 1990; 46: 138-144
- [83] Parker RJ, Eastman A, Bostick-Bruton F, Reed E. *Acquired cisplatin resistance in human ovarian cancer cells is associated with enhanced repair of cisplatin-DNA lesions and reduced drug accumulation.* J Clin Invest 1991; 87: 772-777
- [84] Hill BT, Scanlon KJ, Hansson J et al. *Deficient repair of cisplatin-DNA adducts identified in human testicular teratoma cell lines established from tumours from untreated patients.* Eur J Cancer 1994; 30A: 832-837
- [85] Johnson SW, Shen D, Pastan I, Gottesman MM, Hamilton TC. *Cross-resistance, cisplatin accumulation, and platinum-DNA adduct formation and removal in cisplatin-sensitive and -resistant human hepatoma cell lines.* Exp Cell Res 1996; 226: 133-139
- [86] Johnson SW, Perez RP, Godwin AK et al. *Role of platinum-DNA adduct formation and removal in cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines.* Biochem Pharmacol 1994; 47: 689-697
- [87] De Pooter CM, Van Oosterom AT, Scalliet PG, Maes RA, de Bruijn EA. *Correlation of the response to cisplatin of human ovarian cancer cell lines, originating from one tumor but with different sensitivity, with the recovery of DNA adducts.* Biochem Pharmacol 1996; 51: 629-634
- [88] Andrews PA, Velury S, Mann SC, Howell SB. *cis-Diamminedichloroplatinum(II) accumulation in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cells.* Cancer Res 1988; 48: 68-73
- [89] Nicolson MC, Orr RM, O'Neill CF, Harrap KR. *The role of platinum uptake and glutathione levels in L1210 cells sensitive and resistant to cisplatin, tetraplatin or carboplatin.* Neoplasma 1992; 39: 189-195
- [90] Loh SY, Mistry P, Kelland LR, Abel G, Harrap KR. *Reduced drug accumulation as a major mechanism of acquired resistance to cisplatin in a human ovarian carcinoma cell line: circumvention studies using novel platinum (II) and (IV) ammine/amine complexes.* Br J Cancer 1992; 66: 1109-1115
- [91] Hill BT, Shellard SA, Fichtinger-Schepman AM, Schmoll HJ, Harstrick A. *Differential formation and enhanced removal of specific cisplatin-DNA adducts in two cisplatin-selected resistant human testicular teratoma sublines.* Anticancer Drugs 1994; 5: 321-328
- [92] Zhengdong L, Duhong B. *Experimental study on the mechanism of cisplatin resistance and its reversion in human ovarian cancer.* Chin Med J 1995; 109: 353-355
- [93] Lindauer E, Holler E. *Cellular distribution and cellular reactivity of platinum (II) complexes.* Biochem Pharmacol 1996; 52: 7-14
- [94] Koga H, Kotoh S, Nakashima M, Yokomizo A, Tanaka M, Naito S. *Accumulation of intracellular platinum is correlated with intrinsic cisplatin resistance in human bladder cancer cell lines.* Int J Oncol 2000; 16: 1003-1007
- [95] Chau Q, Stewart DJ. *Cisplatin efflux, binding and intracellular pH in the HTB56 human lung adenocarcinoma cell line and the E-8/0.7 cisplatin-resistant variant.* Cancer Chemother Pharmacol 1999; 44: 193-202

- [96] Welz B, Sperling M. *Boris L'vov und die Graphitküvette*. In: Welz B, Sperling M. (Hrsg.): *Atomabsorptionsspektrometrie*, Wiley-VCH, Weinheim, 1997; 29-38
- [97] Kloft C, Eickhoff C, Schulze-Forster K, Maurer HR, Schunack W, Jaehde U. *Development and application of a simple assay to quantify cellular adducts of platinum complexes with DNA*. *Pharm Res* 1999; 16: 470-473
- [98] Pieck AC. *Pharmakokinetik und Platin-DNA-Adduktbildung von Oxaliplatin*. Universität Bonn, Dissertation 2004
- [99] Welz B, Sperling M. *Der Zeeman-Effekt*. In: Welz B, Sperling M. (Hrsg.): *Atomabsorptionsspektrometrie*. Wiley-VCH, Weinheim, 1997; 102-108
- [100] U.S. Department of Health and Human Services, FDA, CDER and CVM: Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, 2001
- [101] Shah VP, Midha KK, Findlay JWA, Hill HM, Hulse JD, McGilveray IJ, McKay G, Miller KJ, Patnaik RN, Powell ML, Tonelli A, Viswanathan CT, Yacobi A. *Bioanalytical method validation - a revisit with a decade progress*. *Pharm Res* 2000; 17: 1551-1557
- [102] Gastl G, Berdel W, Edler L, Jaehde U, Port R, Mross K, Scheulen M, Sindermann H, Dittrich C. *Standard Operating Procedures for Clinical Trials of the CESAR Central European Society for Anticancer Drug Research – EWIV: SOP 12: Validation of Bioanalytical Methods*. *Onkologie* 2003; 26 (Suppl. 6): 52-55
- [103] Parmentier C, Wellman M, Nicolas A, Siest G, Leroy P. *Simultaneous measurement of reactive oxygen species and reduced glutathione using capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection in cultured cell lines*. *Electrophoresis* 1999; 20: 2938-2944
- [104] Leyers S. *Intrazelluläre Platinkonzentration und DNA-Reparatur in einer cisplatinempfindlichen und -resistenten Ovarialkarzinom-Zelllinie*. Universität Bonn, Diplomarbeit 2004
- [105] Pendyala L, Creaven PJ, Perez R, Zdanowicz JR, Raghavan D. *Intracellular glutathione and cytotoxicity of platinum complexes*. *Cancer Chemother Pharmacol* 1995; 36: 271-278
- [106] Welters MJ, Fichtinger-Schepman AM, Baan RA, Flens MJ, Scheper RJ, Braakhuis BJ. *Role of glutathione, glutathione S-transferases and multidrug resistance-related proteins in cisplatin sensitivity of head and neck cancer cell lines*. *Br J Cancer* 1998; 77: 556-561
- [107] Mueller H, Kassack MU, Wiese M. *Entwicklung von homogenen Microplatereader-basierten Assays zur Untersuchung der Hemmwirkung von Zytostatika gegenüber verschiedenen Krebszelllinien*. Poster DPhG-Doktorandentagung, Düsseldorf 2003
- [108] Otto AM, Brischwein M, Grothe H, Motrescu E, Wolf B. *Multiparametric sensor chips for chemosensitivity testing of sensitive and resistant tumor cells*. In: Reinhold U, Tilgen W. (Hrsg.): *Chemosensitivity testing in oncology*. Springer-Verlag, Berlin; 2003, 39-47
- [109] Reed E, Ostchega Y, Steinberg SM, Yuspa SH, Young RC, Ozols RF, Poirier MC. *Evaluation of platinum-DNA adduct levels relative to known prognostic variables in a cohort of ovarian cancer patients*. *Cancer Res* 1990; 50: 2256-2260
- [110] Perera FP, Motzer RJ, Tang D, Reed E, Parker R, Warburton D, O'Neill P, Albertini R, Bigbee WL, Jensen RH. *Multiple biological markers in germ cell tumor patients treated with platinum-based chemotherapy*. *Cancer Res* 1992; 52: 3558-3565

- [111] Bungo M, Fujiwara Y, Kasahara K et al. *Decreased accumulation as a mechanism of resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II) in human non-small cell lung cancer cell lines: relation to DNA damage and repair.* Cancer Res 1990; 50: 2549-2553
- [112] Chao CC. *Decreased accumulation as a mechanism of resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II) in cervix carcinoma HeLa cells: relation to DNA repair.* Mol Pharmacol 1994; 45: 1137-1144
- [113] Johnson SW, Laub PB, Beesley JS, Ozols RF, Hamilton TC. *Increased platinum-DNA damage tolerance is associated with cisplatin resistance and cross-resistance to various chemotherapeutic agents in unrelated human ovarian cancer cell lines.* Cancer Res 1997; 57: 850-856
- [114] Li Q, Gardner K, Zhang L, Tsang B, Bostick-Bruton F. *Cisplatin induction of ERCC-1 mRNA expression in A2780/CP70 human ovarian cancer cells.* J Biol Chem 1998; 273: 23419-23425
- [115] Yu JJ, Lee KB, Mu C et al. *Comparison of two human ovarian carcinoma cell lines (A2780/CP70 and MCAS) that are equally resistant to platinum, but differ at codon 118 of the ERCC1 gene.* Int J Oncol 2000; 16: 555-560
- [116] Tsai CM, Chang KT, Li L, Perng RP, Yang LY. *Interrelationships between cellular nucleotide excision repair, cisplatin cytotoxicity, HER-2/neu gene expression, and epidermal growth factor receptor level in non-small cell lung cancer cells.* Jpn J Cancer Res 2000; 91: 213-222
- [117] Reed E. *Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti-cancer chemotherapy.* Cancer Treat Rev 1998; 24: 331-44
- [118] Brown R. *Cisplatin resistance in ovarian cancer.* In: Kelland L, Farrel N (Hrsg.): *Platinum-based drugs in cancer therapy.* Humana Press, Totowa New Jersey, 2000; 115-128
- [119] Holzer AK, Katano K, Klomp LWJ, Howell SB. *Cisplatin rapidly down-regulates its own influx transporter hCTR1 in cultured human ovarian carcinoma cells.* Clin Cancer Res 2004; 10: 6711-6749
- [120] Brozovic A, Fritz G, Christmann M, Zisowsky J, Jaehde U, Osmak M, Kaina B. *Long-term activation of SAPK/JNK, p38 kinase and fas-L expression by cisplatin is attenuated in human carcinoma cells that acquired drug resistance.* Int J Cancer 2004; 112: 974-85
- [121] Heim M, Sharifi M, Hilger RA, Scheulen ME, Seeber S, Strumberg D. *Antitumor effect and potentiation or reduction in cytotoxic drug activity in human colon carcinoma cells by the Raf kinase inhibitor (RKI) BAY 43-9006.* Int J Clin Pharmacol Ther 2003; 41: 616-617
- [122] Kupsch P, Passarge K, Richly H, Wiesmann K, Hilger RA, Haase CG, Schwartz B, Scheulen ME, Seeber S, Strumberg D. *Results of a phase I trial of BAY 43-9006 in combination with oxaliplatin in patients with refractory solid tumors.* J Clin Oncol 2004; 22: 3056
- [123] Tietze F. *Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues.* Anal Biochem 1969; 27: 502-22
- [124] Griffith OW. *Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine.* Anal Biochem 1980; 106: 207-12
- [125] Chen G, Hutter KJ, Zeller WJ. *Positive correlation between cellular glutathione and acquired cisplatin resistance in human ovarian cancer cells.* Cell Biol Toxicol 1995; 11: 273-281

- 
- [126] Sugimoto C, Matsukawa S, Fujieda S et al. *Involvement of intracellular glutathione in induction of apoptosis by cisplatin in a human pharyngeal carcinoma cell line*. *Anticancer Res* 1996; 16: 675-680
- [127] Pendyala L, Creaven PJ, Perez R, Zdanowicz JR, Raghavan D. *Intracellular glutathione and cytotoxicity of platinum complexes*. *Cancer Chemother Pharmacol* 1995; 36: 271-278
- [128] Newkirk K, Heffern J, Sloman-Moll E, Sessions RB, Rasmussen AA, Andrews PA, Cullen KJ. *Glutathione content but not gamma glutamyl cystein synthetase mRNA expression predicts cisplatin resistance in head and neck cancer cell lines*. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997; 40: 75-80
- [129] Goto S, Iida T, Cho S, Oka M, Kohno S, Kondo T. *Overexpression of glutathione S-transferase  $\pi$  enhances the adduct formation of cisplatin with glutathione in human cancer cells*. *Free Rad Res* 1999; 31: 549-558
- [130] Koga H, Kotoh S, Nakashima M, Yokomizo A, Tanaka M, Naito S. *Accumulation of intracellular platinum is correlated with intrinsic cisplatin resistance in human bladder cancer cell lines*. *Int J Oncol* 2000; 16: 1003-1007
- [131] Borud O, Mortensen B, Mikkelsen IM, Leroy P, Wellman M, Huseby NE. *Regulation of  $\gamma$ -glutamyltransferase in cisplatin-resistant and -sensitive colon carcinoma cells after acute cisplatin and oxidative stress exposures*. *Int J Cancer* 2000; 88: 464-468
- [132] Ikeda K, Miura K, Himeno S, Imura N, Naganuma A. *Glutathione content is correlated with the sensitivity of lines of PC12 cells to cisplatin without a corresponding change in the accumulation of platinum*. *Mol Cell Biochem* 2001; 219: 51-56
- [133] Zhang K, Chew M, Yang EB, Wong KP, Mack P. *Modulation of cisplatin cytotoxicity and cisplatin-induced DNA cross-links in HepG2 cells by regulation of glutathione-related mechanisms*. *Mol Pharmacol* 2001; 59: 837-843
- [134] Fokkema E, Groen HJM, Helder MN, de Vries EGE, Meijer C. *JM216-, JM118-, and cisplatin-induced cytotoxicity in relation to platinum-DNA adduct formation, glutathione levels and p53 status in human tumour cell lines with different sensitivities to cisplatin*. *Biochem Pharmacol* 2002; 63: 1989-1996

## Anhang A

### Charakterisierung der Zelllinien

#### Bestimmung der Zellgröße und des Zellvolumens

Bestimmung der mittleren Zelldurchmesser [ $\mu\text{m}$ ]

Zelllinie	2102	2102 Klon B	A2780	A2780 cis	HeLa	HeLa CK
n	6	6	8	8	7	7
	18,73	20,11	13,68	14,62	16,91	19,51
	18,90	20,14	13,42	14,31	16,69	18,91
	18,74	19,59	13,64	15,94	17,52	19,41
	17,91	19,78	14,01	15,39	16,93	18,98
	18,40	19,49	12,42	14,18	16,87	19,61
	17,73	19,81	13,50	14,76	17,21	17,88
			12,50	14,45	16,66	17,94
			13,31	15,12		
<b>Mittelwert</b>	18,40	19,82	13,31	14,85	16,97	18,89
<b>SD</b>	0,48	0,26	0,56	0,60	0,30	0,72

## Bestimmung des mittleren Zellvolumens [pL]

<b>Zelllinie</b>	<b>2102</b>	<b>2102 Klon B</b>	<b>A2780</b>	<b>A2780 cis</b>	<b>HeLa</b>	<b>HeLa CK</b>
<b>n</b>	6	6	8	8	7	7
	4,14	5,37	1,63	1,85	3,00	4,50
	4,21	5,16	1,44	1,76	2,87	4,18
	4,11	4,79	1,53	2,37	3,27	4,63
	3,55	4,80	1,64	2,19	2,92	4,33
	3,79	4,73	1,20	1,74	2,99	4,63
	3,59	4,91	1,48	1,92	3,18	3,41
			1,15	1,96	2,85	3,47
			1,40	2,09		
<b>Mittelwert</b>	3,90	4,96	1,44	1,99	3,01	4,16
<b>SD</b>	0,29	0,25	0,18	0,22	0,16	0,52



### Zytotoxizitätstests zur Bestimmung der EC<sub>50</sub>

MTT-Assay Hodenkarzinomzellen 2102 (n = 18)

log [Cisplatin]	Absorption [Units]		Absorption [%]	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
- 11	0,354	0,020	100,0	5,6
- 9	0,315	0,010	89,0	2,7
- 8	0,326	0,031	92,2	8,7
- 7	0,298	0,025	84,3	7,0
- 6,5	0,277	0,018	78,2	5,1
- 6	0,205	0,022	57,9	6,1
- 5,5	0,035	0,025	9,7	7,0
- 5	0,006	0,003	1,8	0,9
- 4,5	0,003	0,002	0,8	0,7
- 4	0,004	0,003	1,2	0,9

MTT-Assay Hodenkarzinomzellen 2102 Klon A (n = 18)

log [Cisplatin]	Absorption [Units]		Absorption [%]	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
- 11	0,336	0,020	100,0	6,0
- 9	0,326	0,029	97,0	8,7
- 8	0,315	0,024	93,7	7,2
- 7	0,326	0,025	97,1	7,3
- 6,5	0,305	0,027	90,8	8,0
- 6	0,238	0,017	70,8	5,0
- 5,5	0,089	0,010	26,6	2,9
- 5	0,021	0,005	6,4	1,5
- 4,5	0,010	0,003	2,8	0,8
- 4	0,007	0,002	2,0	0,5

## MTT-Assay Hodenkarzinomzellen 2102 Klon B (n = 18)

log [Cisplatin]	Absorption [Units]		Absorption [%]	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
- 11	0,158	0,023	100,0	14,7
- 9	0,166	0,014	104,7	8,7
- 8	0,157	0,019	99,0	11,7
- 7	0,175	0,013	110,6	8,8
- 6,5	0,169	0,022	106,8	14,2
- 6	0,143	0,025	90,5	15,6
- 5,5	0,070	0,009	44,3	5,4
- 5	0,016	0,016	10,0	9,9
- 4,5	0,012	0,013	7,8	8,3
- 4	0,010	0,020	6,4	12,9

## MTT-Assay Hodenkarzinomzellen 2102 Klon E (n = 18)

log [Cisplatin]	Absorption [Units]		Absorption [%]	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
- 11	0,559	0,047	100,0	8,3
- 9	0,567	0,033	101,4	6,0
- 8	0,521	0,041	93,2	7,4
- 7	0,524	0,041	93,7	7,3
- 6,5	0,414	0,033	74,1	5,9
- 6	0,328	0,021	58,7	4,1
- 5,5	0,175	0,014	31,2	2,5
- 5	0,075	0,006	13,4	1,1
- 4,5	0,043	0,003	7,7	0,6
- 4	0,031	0,003	5,5	0,6

MTT-Assay Ovarialkarzinomzellen A2780 (n = 18)

<b>log [Cisplatin]</b>	<b>Absorption [Units]</b>		<b>Absorption [%]</b>	
	<b>Mittelwert</b>	<b>SD</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>SD</b>
- 10	0,549	0,051	100,0	9,2
- 7	0,461	0,035	84,0	6,4
- 6	0,349	0,053	63,6	9,7
- 5,5	0,174	0,018	31,7	3,2
- 5	0,063	0,024	11,5	4,4
- 4,5	0,009	0,004	1,7	0,8
- 4	0,002	0,005	0,4	0,9
- 3,5	0,009	0,019	1,7	3,4

MTT-Assay Ovarialkarzinomzellen A2780 cis (n = 18)

<b>log [Cisplatin]</b>	<b>Absorption [Units]</b>		<b>Absorption [%]</b>	
	<b>Mittelwert</b>	<b>SD</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>SD</b>
- 10	0,351	0,023	100,0	6,6
- 7	0,297	0,020	84,5	5,8
- 6	0,300	0,017	85,5	4,7
- 5,5	0,226	0,020	64,4	5,7
- 5	0,155	0,008	44,0	2,1
- 4,5	0,060	0,013	17,0	3,7
- 4	0,013	0,012	3,7	3,5
- 3,5	0,023	0,031	6,7	8,8

## MTT-Assay Zervixkarzinomzellen HeLa (n = 18)

log [Cisplatin]	Absorption [Units]		Absorption [%]	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
- 10	0,683	0,035	100,0	5,1
- 7	0,611	0,037	89,5	6,0
- 6	0,469	0,018	68,8	3,7
- 5,5	0,415	0,012	60,8	2,8
- 5	0,212	0,004	31,0	1,7
- 4,5	0,070	0,001	10,2	0,3
- 4	0,070	0,001	10,3	0,2
- 3,5	0,070	0,001	10,2	0,4

## MTT-Assay Zervixkarzinomzellen HeLa CK (n = 18)

log [Cisplatin]	Absorption [Units]		Absorption [%]	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
- 10	0,188	0,015	100,0	7,8
- 7	0,198	0,007	105,1	3,6
- 6	0,171	0,005	90,9	3,0
- 5,5	0,146	0,002	77,7	1,5
- 5	0,131	0,005	69,6	3,4
- 4,5	0,031	0,001	16,5	0,7
- 4	0,022	0,001	11,9	0,8
- 3,5	0,030	0,001	15,8	0,9

## Anhang B

### Quantifizierung der DNA-Platinierung

#### Einfluss von Ribonuclease auf die DNA-Platinierung

Einfluss von RNase auf die berechnete DNA-Menge

	Berechnete DNA-Menge [ $\mu\text{g}$ ]	
	<i>ohne</i> RNase	<i>mit</i> RNase
	35,35	19,15
	25,90	14,20
	17,25	16,45
	21,35	15,60
	20,88	13,59
	22,56	17,22
	22,35	12,27
	21,15	16,08
<b>Mittelwert</b>	23,35	15,57
<b>SD</b>	5,40	2,18

Einfluss von RNase auf das Platin-Nukleotid-Verhältnis

Cisplatinkonz. [ $\mu\text{M}$ ]	Pt-Atome / $10^4$ Nukleotide		<i>mit</i> RNase / <i>ohne</i> RNase [%]
	<i>ohne</i> RNase	<i>mit</i> RNase	
25	0,39	0,26	66,84
50	0,85	0,70	82,95
100	2,07	2,02	97,58
25	0,77	0,54	69,53
50	1,60	1,11	69,34
100	2,85	2,55	89,34
<b>Mittelwert</b>			79,26
<b>SD</b>			12,63

## Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit

Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der DNA-Platinierung in der Hodenkarzinomzelllinie 2102

Cisplatinkonzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Pt-Atome / $10^4$ Nukleotide			
	10	0,23	0,31	0,44
25	0,27	0,32	0,74	0,76
50	0,59	0,49	1,50	1,60
100	0,73	0,87	4,20	4,30
Inkubationszeit [h]	2	2	4	4

## DNA-Platinierung

DNA-Platinierung in der cisplatin sensitiven und -resistenten Hodenkarzinomzelllinie (n = 3)

Zelllinie	Cisplatinkonz. [ $\mu\text{M}$ ]	Pt-Atome / $10^4$ Nukleotide				
		1	2	3	Mittelwert	SD
<b>2102</b>	25	0,75	0,53	0,50	0,59	0,14
	50	0,93	1,12	1,02	1,02	0,10
	75	1,53	1,60	1,69	1,61	0,08
	100	2,03	1,89	2,05	1,99	0,09
	125	2,49	2,29	2,53	2,44	0,13
<b>2102 Klon B</b>	25	0,26	0,35	0,23	0,28	0,06
	50	0,51	0,69	0,55	0,58	0,10
	75	0,82	1,13	1,02	0,99	0,16
	100	1,14	1,35	1,11	1,20	0,13
	125	1,53	1,71	1,56	1,60	0,10

DNA-Platinierung in der cisplatin sensitiven und -resistenten Ovarialkarzinomzelllinie (n = 3)

Zelllinie	CisplatinKonz. [µM]	Pt-Atome / 10 <sup>4</sup> Nukleotide				
		1	2	3	Mittelwert	SD
<b>A2780</b>	25	0,67	0,71	0,56	0,66	0,06
	50	1,71	1,65	1,38	1,58	0,18
	75	2,51	2,25	2,62	2,46	0,19
	100	3,63	4,11	3,49	3,74	0,33
<b>A2780 cis</b>	25	0,153	0,256	0,118	0,18	0,07
	50	0,322	0,398	0,297	0,34	0,05
	75	0,429	0,516	0,411	0,45	0,06
	100	0,62	0,831	0,602	0,68	0,13

DNA-Platinierung in der cisplatin sensitiven und -resistenten Ovarialkarzinomzelllinie nach längerer Kultivierung (n = 3)

Zelllinie	CisplatinKonz. [µM]	Pt-Atome / 10 <sup>4</sup> Nukleotide				
		1	2	3	Mittelwert	SD
<b>A2780</b>	25	0,37	0,26	0,34	0,32	0,05
	50	0,63	0,66	0,57	0,62	0,05
	75	1,08	0,94	1,06	1,02	0,08
	100	1,55	1,32	1,83	1,57	0,25
<b>A2780 cis</b>	25	0,17	0,22	0,16	0,18	0,03
	50	0,36	0,31	0,42	0,36	0,06
	75	0,50	0,61	0,50	0,53	0,06
	100	0,86	0,85	0,92	0,88	0,04

DNA-Platinierung in der cisplatin-sensitiven und -resistenten Zervixkarzinomzelllinie (n = 6)

Zelllinie	Cisplatin-konz. [µM]	Pt-Atome / 10 <sup>4</sup> Nukleotide						Mittelwert	SD
		1	2	3	4	5	6		
<b>HeLa</b>	25	0,52	0,45	0,44	0,52	0,52	0,53	0,50	0,04
	50	1,21	1,37	1,43	0,96	1,09	1,07	1,19	0,18
	75	2,43	2,63	2,52	2,11	2,48	2,19	2,39	0,20
	100	2,82	3,18	2,39	3,28	3,73	3,38	3,13	0,47
<b>HeLa CK</b>	25	0,28	0,31	0,35	0,21	0,19	0,23	0,26	0,06
	50	0,91	0,93	0,82	0,55	0,47	0,46	0,69	0,22
	75	1,60	1,71	1,26	0,85	0,88	0,99	1,21	0,37
	100	2,19	---*	1,87	1,22	1,37	1,22	1,58	0,44

\* Probe aufgetaut



## Anhang C

### Quantifizierung der DNA-Reparaturgeschwindigkeit

#### DNA-Reparatur in Ovarialkarzinomzellen

Veränderung der DNA-Platinierung in der Ovarialkarzinomzelllinie A2780 nach Inkubation mit cisplatinfreiem Medium (Vorinkubation mit 100  $\mu$ M Cisplatin; n = 3)

Reparaturzeit [h]	Pt-Atome / $10^5$ Nukleotide				
	1	2	3	Mittelwert	SD
0	6,75	8,93	4,97	6,88	1,99
2	6,28	6,00	5,46	5,91	0,41
4	4,07	3,78	5,58	4,48	0,97
8	2,16	3,69	2,28	2,71	0,85

Veränderung der DNA-Platinierung in der Ovarialkarzinomzelllinie A2780 cis nach Inkubation mit cisplatinfreiem Medium (Vorinkubation mit 100  $\mu$ M Cisplatin; n = 3)

Reparaturzeit [h]	Pt-Atome / $10^5$ Nukleotide				
	1	2	3	Mittelwert	SD
0	2,03	1,93	2,22	2,06	0,15
2	2,67	2,16	2,40	2,41	0,25
4	1,92	2,01	1,61	1,85	0,21
8	1,95	1,52	1,39	1,62	0,29

Veränderung der DNA-Platinierung in der Ovarialkarzinomzelllinie A2780 cis nach Inkubation mit cisplatinfreiem Medium (Vorinkubation mit 400  $\mu$ M Cisplatin; n = 3)

Reparaturzeit [h]	Pt-Atome / $10^5$ Nukleotide				
	1	2	3	Mittelwert	SD
0	1,35	1,028	2,314	1,565	0,67
2	1,14	1,40	0,88	1,14	0,26
4	0,97	0,67	1,07	0,90	0,21

## DNA-Reparatur in Zervixkarzinomzellen

Veränderung der DNA-Platinierung in der Zervixkarzinomzelllinie HeLa nach Inkubation mit cisplatinfreiem Medium (Vorinkubation mit 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin; n = 3)

Reparaturzeit [h]	Pt-Atome / $10^5$ Nukleotide				
	1	2	3	Mittelwert	SD
0	7,36	7,05	7,79	7,40	0,37
2	6,10	5,66	5,91	5,89	0,22
4	5,49	5,27	5,00	5,25	0,25
8	4,30	4,93	5,38	4,87	0,54

Veränderung der DNA-Platinierung in der Zervixkarzinomzelllinie HeLa CK nach Inkubation mit cisplatinfreiem Medium (Vorinkubation mit 200  $\mu\text{M}$  Cisplatin; n = 3)

Reparaturzeit [h]	Pt-Atome / $10^5$ Nukleotide				
	1	2	3	Mittelwert	SD
0	13,00	9,41	10,90	11,10	1,80
2	9,72	9,86	10,20	9,93	0,25
4	8,64	8,29	10,50	9,14	1,19
8	7,72	6,74	6,95	7,14	0,52

## Anhang D

### Quantifizierung der intrazellulären Platinkonzentration

#### Uptake

Intrazelluläre Platinkonzentration während der Inkubation mit 100  $\mu$ M Cisplatin in Ovarialkarzinomzellen A2780 (n = 3)

Inkubations- zeit [min]	Pt [ng] / Zellvolumen [ $\mu$ L]				
	1	2	3	Mittelwert	SD
2	0,45	0,43	0,32	0,40	0,07
5	0,72	0,61	0,63	0,65	0,06
10	1,72	1,15	1,99	1,62	0,43
60	14,73	13,29	8,72	12,25	3,14
120	26,28	28,76	20,98	25,34	3,97

Intrazelluläre Platinkonzentration während der Inkubation mit 100  $\mu$ M Cisplatin in Ovarialkarzinomzellen A2780 cis (n = 3)

Inkubations- zeit [min]	Pt [ng] / Zellvolumen [ $\mu$ L]				
	1	2	3	Mittelwert	SD
2	0,17	0,19	0,18	0,18	0,01
5	0,39	0,58	0,44	0,47	0,10
10	0,58	0,58	0,35	0,50	0,13
60	4,3	3,4	3,21	3,64	0,58
120	9,42	7,86	8,78	8,69	0,78

Intrazelluläre Platinkonzentration während der Inkubation mit 100  $\mu$ M Cisplatin in Zervixkarzinomzellen HeLa (n = 3)

Inkubations- zeit [min]	Pt [ng] / Zellvolumen [ $\mu$ L]				
	1	2	3	Mittelwert	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,36	0,14	0,31	0,27	0,12
5	0,73	0,80	0,66	0,73	0,07
10	1,60	1,67	1,88	1,72	0,15
60	13,45	11,89	13,31	12,88	0,87
120	27,27	25,45	28,39	27,04	1,48

Intrazelluläre Platinkonzentration während der Inkubation mit 100  $\mu$ M Cisplatin in Zervixkarzinomzellen HeLa CK (n = 3)

Inkubations- zeit [min]	Pt [ng] / Zellvolumen [ $\mu$ L]				
	1	2	3	Mittelwert	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,15	0,12	0,13	0,13	0,01
5	0,23	0,24	0,30	0,26	0,04
10	0,42	0,52	0,66	0,53	0,12
60	3,64	4,14	4,20	3,99	0,31
120	8,25	8,95	8,64	8,61	0,35

**Efflux**

Veränderung der intrazellulären Platinkonzentration nach Ende der Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin für 2 h in Ovarialkarzinomzellen A2780 (n = 3)

Effluxzeit [min]	Pt [ng] / Zellvolumen [ $\mu\text{L}$ ]				
	1	2	3	Mittelwert	SD
0	21,2	26,6	29,4	25,7	4,1
2	18,5	25,2	24,8	22,8	3,8
5	16,9	18,1	20,3	18,4	1,7
10	13,8	14,9	11,1	13,3	2,0
60	12,8	15,6	13,9	14,1	1,4

Veränderung der intrazellulären Platinkonzentration nach Ende der Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin für 2 h in Ovarialkarzinomzellen A2780 cis (n = 3)

Effluxzeit [min]	Pt [ng] / Zellvolumen [ $\mu\text{L}$ ]				
	1	2	3	Mittelwert	SD
0	9,4	7,9	8,8	8,7	0,8
2	9,0	8,1	9,8	9,0	0,9
5	9,4	8,5	8,9	8,9	0,5
10	8,2	9,9	7,8	8,6	1,1
60	8,2	7,1	6,3	7,2	1,0

Veränderung der intrazellulären Platinkonzentration nach Ende der Inkubation mit 300  $\mu\text{M}$  Cisplatin für 2 h in Ovarialkarzinomzellen A2780 cis (n = 2)

Effluxzeit [min]	Pt [ng] / Zellvolumen [ $\mu\text{L}$ ]		
	1	2	Mittelwert
0	28,1	73,7	50,9
2	40,7	46,8	43,7
5	37,5	32,0	34,7
10	15,9	34,9	25,4
60	30,1	19,2	24,6

Veränderung der intrazellulären Platinkonzentration nach Ende der Inkubation mit 100  $\mu$ M Cisplatin für 2 h in Zervixkarzinomzellen HeLa (n = 3)

Effluxzeit [min]	Pt [ng] / Zellvolumen [ $\mu$ L]				
	1	2	3	Mittelwert	SD
0	21,55	21,32	23,46	22,11	1,17
2	19,84	21,24	27,34	22,81	3,99
5	21,12	24,25	21,14	22,17	1,81
10	23,71	28,26	25,21	25,73	2,32
60	25,34	26,96	24,75	25,69	1,15
120	19,26	20,30	26,71	22,09	4,04

Veränderung der intrazellulären Platinkonzentration nach Ende der Inkubation mit 100  $\mu$ M Cisplatin für 2 h in Zervixkarzinomzellen HeLa CK (n = 3)

Effluxzeit [min]	Pt [ng] / Zellvolumen [ $\mu$ L]				
	1	2	3	Mittelwert	SD
0	13,97	12,60	13,36	13,31	0,69
2	13,80	12,34	12,37	12,84	0,83
5	13,36	13,26	14,61	13,74	0,75
10	12,83	12,37	15,99	13,73	1,97
60	12,57	12,17	11,86	12,20	0,36
120	13,26	12,85	12,62	12,91	0,32

## Anhang E

### Anwendung der Quantifizierung von DNA-Platinierung und intrazellulärer Platinkonzentration

#### DNA-Platinierung und intrazelluläre Platinkonzentration in Hamster-Fibroblasten

DNA-Platinierung in der cisplatinsensitiven und -hypersensitiven Hamster-Fibroblastenzelllinie V79B und CL-V5B (n = 3)

Zelllinie	Cisplatinkonz. [µM]	Pt-Atome / 10 <sup>4</sup> Nukleotide				
		1	2	3	Mittelwert	SD
<b>V79B</b>	25	0,46	0,46	0,46	0,46	0,00
	50	0,56	1,13	1,59	1,09	0,52
	75	1,69	2,15	3,29	2,38	0,82
	100	2,74	3,23	4,94	3,64	1,16
<b>CL-V5B</b>	25	0,37	0,36	0,00	0,24	0,21
	50	0,67	0,32	0,80	0,60	0,25
	75	1,06	1,14	1,49	1,23	0,23
	100	1,65	1,49	2,86	2,00	0,75

Intrazelluläre Platinkonzentrationen in der cisplatinsensitiven und -hypersensitiven Hamster-Fibroblastenzelllinie V79B und CL-V5B (n = 2)

Zelllinie	Cisplatinkonz. [µM]	Pt [ng] / 10 <sup>7</sup> Zellen		
		1	2	Mittelwert
<b>V79B</b>	25	99,4	105,2	102,3
	50	190,7	154,4	172,6
	75	247,0	307,3	277,1
	100	403,5	425,6	414,6
<b>CL-V5B</b>	25	77,0	64,6	70,8
	50	121,8	128,4	125,1
	75	200,8	199,2	200,0
	100	336,9	241,4	289,1

### Einfluss eines Raf-Kinase-Inhibitors auf die DNA-Platinierung und die intrazelluläre Platinkonzentration

DNA-Platinierung in der Lungenkarzinomzelllinie HCT8 nach Inkubation mit Cisplatin (Cis) mit und ohne Testsubstanz (TS) (n = 3)

Inkubations- schema	Pt-Atome / 10 <sup>5</sup> Nukleotide			
	Cis 4 h	Cis + TS 4 h	Cis 4 h, TS 4 h	Cis 4 h, Medium 4 h
<b>1</b>	1,76	0,51	1,45	2,40
<b>2</b>	1,92	0,40	1,40	1,80
<b>3</b>	1,71	0,42	1,79	1,54
<b>Mittelwert</b>	1,78	0,44	1,55	1,91
<b>SD</b>	0,1	0,06	0,21	0,44



DNA-Platinierung in der Lungenkarzinomzelllinie HCT8 nach Inkubation mit Oxaliplatin (Oxa) mit und ohne Testsubstanz (TS) (n = 3)

Inkubations- schema	Pt-Atome / 10 <sup>5</sup> Nukleotide			
	Oxa 4 h	Oxa + TS 4 h	Oxa 4 h, TS 4 h	Oxa 4 h, Medium 4 h
1	1,12	0,25	0,78	1,29
2	1,18	0,21	1,25	0,75
3	1,39	0,87	1,55	0,91
<b>Mittelwert</b>	1,23	0,44	1,19	0,98
<b>SD</b>	0,14	0,37	0,39	0,28

Intrazelluläre Platinkonzentration in der Lungenkarzinomzelllinie HCT8 nach Inkubation mit Cisplatin (Cis) bzw. Oxaliplatin (Oxa) mit und ohne Testsubstanz (TS) (n = 3)

Inkubations- schema	Pt [ng] / 10 <sup>6</sup> Zellen			
	Cis 4h	Cis + TS 4 h	Oxa 4 h	Oxa + TS 4 h
1	9,61	3,60	5,26	2,69
2	11,32	3,86	6,65	2,15
3	13,28	4,37	n.b.	n.b.
<b>Mittelwert</b>	11,40	3,94	5,96	2,42
<b>SD</b>	1,84	0,39	n.b.	n.b.

## Anhang F

### Quantifizierung der intrazellulären Glutathionkonzentration

#### Validierung

Richtigkeit (RE [%]) und Präzision (RSD [%]) der CE-Methode zur Bestimmung von intrazellulärem Glutathion an der Bestimmungsgrenze (3  $\mu\text{M}$ )

	<b>Peakfläche</b>	<b>Berechnete Konzentration [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	<b>RE [%]</b>
	1309749	2,87	-4,3
	1170988	2,71	-9,6
	1248497	2,80	-6,7
	1562255	3,17	5,7
	1526806	3,13	4,3
<b>Mittelwert</b>	1363659	2,94	-2,1
<b>SD</b>	172734		
<b>RSD [%]</b>	12,7		

Wiederfindung von Glutathion im Zelllysat

	<b>Zelllysat</b>	<b>+ 80 <math>\mu\text{M}</math> GSH</b>	<b>+ 40 <math>\mu\text{M}</math> GSH</b>	<b>+ 5 <math>\mu\text{M}</math> GSH</b>
<b>Peakfläche</b>	2840550	48957160	25309788	4709427
	2683612	59137864	28074206	4553702
	2945887	50365328	30579762	5093815
<b>Mittelwert</b>	2823350	52820117	27987918	4785648
<b>Korrigierte Peakfläche*</b>	0	49996768	25164569	1962298
<b>Berechnete Konzentration [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	–	80,23	41,26	4,85
<b>Wiederfindung [%]</b>	–	100,3	103,1	97,0

\*Korrigierte Peakfläche = mittlere Peakfläche der gespikten Probe – mittleren Peakfläche des Zelllysates

Richtigkeit (RE [%]) und Between-day-Präzision (RSD [%]) der CE-Methode zur Bestimmung von intrazellulärem Glutathion

<b>GSH-QC-Probe [µM]</b>	<b>Peakfläche</b>	<b>Berechnete Konzentration [µM]</b>	<b>RE [%] der Einzelmessung</b>	<b>RE [%]</b>	<b>RSD [%]</b>
90	79997384	88,21	-2,0		
	76080544	93,60	4,0		
	72354975	91,91	2,1		
	77418672	88,77	-1,4		
	76539376	96,05	16,7		
	68082944	88,80	-1,3	1,4	3,5
50	46966152	52,45	4,9		
	38481428	48,09	-3,8		
	39377174	50,89	1,8		
	43485752	50,42	0,8		
	42682092	54,14	8,3		
	38410192	50,58	1,2	2,2	4,0
5	3057488	4,91	-1,8		
	2956062	5,08	1,6		
	2579522	5,11	2,2		
	3334519	5,05	1,0		
	2780777	4,74	-5,2		
	2826308	4,74	-5,2	-0,8	4,0

Within-day-Präzision (RSD [%]) der CE-Methode zur Bestimmung von intrazellulärem Glutathion

<b>GSH-QC-Probe [<math>\mu</math>M]</b>	<b>90</b>	<b>50</b>	<b>5</b>
<b>Peakfläche</b>	72976632	31362968	2577991
	71685496	33811040	2559446
	76574880	32699360	2468848
	76903584	35064688	2552154
	74879672	32885198	2436386
	72284928	33607024	2465564
<b>Mittelwert</b>	74217532	33238379	2510064
<b>SD</b>	2231429	1243518	59886
<b>RSD [%]</b>	3,0	3,7	2,4

Stabilität der Glutathion-Stammlösung (Lagerung bei -24 °C)

<b>Datum</b>	<b>16.12.2002</b>	<b>19.12.2002</b>	<b>10.01.2003</b>	<b>20.01.2003</b>	<b>29.01.2003</b>
<b>Zyklus</b>	0	1	2	3	Langzeit
<b>Peakfläche</b>	87643600	71858712	61614736	93371808	83546784
	71112496				
	60498348				
	97903856				
	87458880				
<b>Stabilität [%]</b>		99,0	98,2	104,9	104,7

## Stabilität der Glutathion-Arbeitslösungen bei Raumtemperatur

	<b>Zeit [min]</b>	<b>Peakfläche</b>	<b>Stabilität [%]</b>
<b>GSH-AL1</b>	0	81810200	100,0
	15	87334168	106,8
	30	77682184	95,0
	45	80271040	98,1
	60	78639264	96,1
	90	81361056	99,5
	150	83221056	101,7
	210	78143440	95,5
	300	82016744	100,3
<b>GSH-AL2</b>	0	6667258	100,0
	15	6027833	90,4
	30	7035026	105,5
	45	6970480	104,5
	60	6851899	102,8
	90	6954375	104,3
	150	6228250	93,4
	210	6418462	96,3
	300	6226469	93,4

Stabilität des Derivatisierungsproduktes bei Raumtemperatur nach Derivatisierung der Glutathion-Arbeitslösungen

	<b>Zeit [min]</b>	<b>Peakfläche</b>	<b>Stabilität [%]</b>
<b>GSH-AL1</b>	0	84475856	100,0
	8	83834016	99,2
	16	82727056	97,9
	24	83824016	99,2
	32	81230880	96,2
	40	77886056	92,2
	48	80140328	94,9
	56	79675440	94,3
	64	77802528	92,1
	72	77934392	92,3
	80	78829656	93,3
	88	75355072	89,2
	120	75214640	89,0
<b>GSH-AL2</b>	0	5629900	100,0
	8	5378016	95,5
	16	5434234	96,5
	24	5426014	96,4
	32	5325316	94,6
	40	5239125	93,1
	48	5176742	92,0
	56	5030049	89,3
	64	5042476	89,6
	72	4922000	87,4
	80	4865966	86,4
	88	4829163	85,8
	120	4861220	86,3

## Intrazelluläre Glutathionkonzentrationen in Tumorzellen

Glutathionkonzentration in A2780- und A2780 cis-Zellen

Zelllinie	A2780	A2780 cis
<b>Glutathionkonzentration</b> [ $\mu\text{M}$ ]	7,59	17,50
	6,30	15,01
	7,01	14,02
	6,76	11,51
	7,44	17,27
	7,23	14,42
<b>Mittelwert</b>	7,06	14,96
<b>SD</b>	0,47	2,23
<b>Mittl. Zellvolumen [pL]</b>	1,44	1,98
<b>Zellzahl</b>	$2 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$
<b>Gesamtvolumen [<math>\mu\text{L}</math>]</b>	2,87	3,97
<b>Intrazelluläre</b> <b>Glutathionkonzentration</b> [ $\mu\text{M}$ ]	2,46	3,77
	<b>SD</b>	0,16